

ISSN 0355-1180

HELSINGIN YLIOPISTO

Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta

Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto

EKT-sarja 1948

**Fosfo- ja glykolipidien määrittäminen mikrolevistä
(*Euglena gracilis* ja *Selenastrum* sp.) LC-ELSD- ja LC-MS-menetelmillä**

Johanna Kekäläinen

Helsinki 2020



TIIVISTELMÄ

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Maatalous-metsätieteellinen		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Elintarviketieteiden maisteriohjelma	
Tekijä – Författare – Author Johanna Kekäläinen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Fosfo- ja glykolipidien määrittäminen mikrolevistä (<i>Euglena gracilis</i> ja <i>Selenastrum</i> sp.) LC-ELSD- ja LC-MS-menetelmillä			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Elintarvikekemia			
Työn laji – Arbetets art – Level Maisterintutkielma		Aika – Datum – Month and year Kesäkuu 2020	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 67
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Mikrolevät ovat yksisoluisia organismeja, jotka sisältävät lajista ja kasvatusolosuhteista riippuen proteiineja 25–63 % kuivapainosta, lipidejä 2–25 % kuivapainosta, hiilihydraatteja 35–57 % kuivapainosta ja kivennäisaineita 6–30 % kuivapainosta. Lipideistä 15–57 % on triasyyliglyseroleja ja 0,7–37 % poolisia lipidejä, kuten fosfo- ja glykolipidejä. Mikrolevien koostumusta sekä mikrolevien lipidien uuttoa on tutkittu aiemmin Helsingin yliopistossa, ja näissä tutkimuksissa on herännyt tarve lisätiedolle mikrolevien poolisista lipideistä.</p> <p>Tämän tutkimuksen tavoitteena oli luokitella mikrolevien sisältämät lipidit poolisuuden mukaan selvittäen osuudet rasvahappokoostumuksen perusteella. Lisäksi tavoitteena oli kehittää HPLC-menetelmä mikrolevien fosfo- ja glykolipidien määrittämiseen. Poolisten lipidien rasvahappojen määrittämisessä mikroleväuutteiden lipidit erotettiin poolisuuden mukaan kiinteäfaasiuutolla ja uutteista määritettiin rasvahappopitoisuudet kaasukromatografisesti. HPLC-menetelmä kehitettiin tutkimalla poolisten lipidien profiileja nestekromatografia-valonsirontadetektorilla (LC-ELSD). Kehitetyllä LC-ELSD-menetelmällä tutkittiin <i>Euglena gracilis</i> ja <i>Selenastrum</i> sp. -mikrolevänäytteiden poolisia lipidiluokkia. Mikrolevänäytteissä esiintyvät fosfo- ja glykolipidit tunnistettiin nestekromatografia-massaspektrometrisesti (LC-MS).</p> <p>Tutkimuksen tuloksista selvisi, että <i>Selenastrum</i> sp. -mikrolevän kokonaislipidipitoisuus oli suurempi kuin <i>E. gracilis</i> -mikrolevän. Molemmilla lajeilla eniten rasvahappoja oli poolisissa lipideissä ja molempien lajien rasvahappokoostumukset vaihtelivat kasvatuserästä ja -olosuhteista riippuen. Kehitetyllä LC-ELSD-menetelmällä mikrolevänäytteiden poolisten lipidien profiileissa erotettiin monogalaktoosyyliidiasyyli glyseroli (MGDG) ja fosfolipidit luokkana. Tulosten perusteella MGDG vaikuttaisi olevan yleisin glykolipidi tutkituissa mikrolevänäytteissä ja fosfatidyylietanolamiini yleisin fosfolipidi. Glyko- ja fosfolipidiluokissa ei ollut eroa mikrolevälajien tai kasvatuserien välillä. Mikrolevien MGDG:t vaikuttivat sisältävän monityydyttymättömiä rasvahappoja ja fosfolipidit tyydyttyneitä tai kertatyydyttymättömiä rasvahappoja. Lisätutkimusta tarvitaan poolisten lipidien kvantitatiiviseen määrittämiseen ja menetelmän kehittämiseen fosfolipidien erottumisen osalta.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Mikrolevä, <i>Euglena</i> , <i>Selenastrum</i> , fosfolipidi, glykolipidi, LC-ELSD			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Anna-Maija Lampi, Vieno Piironen			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto, Helda			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information EKT-sarja 1948.			

ABSTRACT

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Master's programme in Food Sciences
Tekijä – Författare – Author Johanna Kekäläinen		
Työn nimi – Arbetets titel – Title Determination of phospho- and glycolipids from microalgae (<i>Euglena gracilis</i> and <i>Selenastrum</i> sp.) using LC-ELSD and LC-MS		
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Food Chemistry		
Työn laji – Arbetets art – Level Master's Thesis	Aika – Datum – Month and year June 2020	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 67
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Microalgae are unicellular eukaryotic or prokaryotic organisms. They consist of proteins (25–63% of dry weight), lipids (2–25% of dry weight), carbohydrates (35–57% of dry weight) and minerals (6–30% of dry weight) depending on the strain and growing conditions. Lipids consist of 15–57% of triacylglycerols and 0.7–37% of polar lipids, such as phospho- and glycolipids. Studies concerning microalgae composition and microalgae lipid extraction have been conducted earlier in the University of Helsinki, and these studies have raised a need for further research about the polar lipids in the microalgae.</p> <p>The aim of this research was to classify microalgae lipids according to polarity by determining fatty acids in each fraction. The aim was also to develop a high performance liquid chromatography method (HPLC) for analysing phospho- and glycolipids in microalgae samples. Fatty acids in microalgae polar lipids were studied using solid phase extraction and gas chromatography. HPLC method for analysing phospho- and glycolipids was developed by studying liquid chromatography evaporative light scattering detector (LC-ELSD) profiles of polar lipids. By using the developed method, microalgae polar lipid profiles were determined and the polar lipids were identified by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS).</p> <p>As a result of this research, lipid concentration of <i>Selenastrum</i> sp. was higher than that of <i>Euglena gracilis</i>. In both strains most of the fatty acids were in polar lipids and in both strains fatty acid composition varied depending on the bioreactor and growing conditions. With the developed LC-ELSD method it was possible to determine monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and phospholipids as a class from the microalgae samples. Based on the results, it seems that MGDG is the most common glycolipid in the investigated microalgae samples and phosphatidylethanolamine is the most common phospholipid. There was no difference in the glyco- and phospholipid classes between the microalgae strains or bioreactors. It seems that microalgae MGDGs contain mostly polyunsaturated fatty acids and phospholipids mostly saturated or monounsaturated fatty acids. More research still has to be done to quantificate the polar lipid classes in microalgae and to develop the method further to reliably separate phospholipids.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Microalgae, <i>Euglena</i> , <i>Selenastrum</i> , phospholipid, glycolipid, LC-ELSD		
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Anna-Maija Lampi, Vieno Piironen		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited E-thesis collection of the University of Helsinki digital archives, Helda		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information EKT Series 1948.		

ESIPUHE

Tämä maisterintutkielma on tehty Helsingin yliopiston elintarvike- ja ravitsemustieteiden osastolla. Toteutin tutkimuksen kokeellisen osion kevään 2016 ja syksyn 2017 välillä. Tutkielma liittyi LEVARBIO-hankkeeseen, jossa tavoitteena oli edistää mikrolevien tuottamien arvojakeiden ja leväbiomassan hyödyntämistä eri sovelluskohteissa. Maisterintutkielmani ohjaajana toimi dosentti Anna-Maija Lampi ja vastuuprofessorina professori Vieno Piironen.

Haluan kiittää ohjaajaani Anna-Maija Lampea arvokkaista neuvoista ja kärsivällisyydestä tutkielman teon aikana. Haluan myös kiittää tutkimusteknikko Miikka Olinia tekniikkaan liittyvästä avusta sekä muuta elintarvike- ja ravitsemustieteiden osaston henkilökuntaa kokeellisen osuuden mahdollistamisesta. Lisäksi haluan kiittää ystävääni Satua sparrausavusta, kumppaniaani Lauria tuesta ja myötäelämisestä sekä tytärtäni Veeraa, jonka ansiosta sain motivaatiota ja kypsytin saattamaan tutkielman päätökseen.

Johanna Kekäläinen

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ.....	2
ABSTRACT	3
ESIPUHE.....	4
SISÄLLYSLUETTELO	5
LYHENTEET	7
LISTAUS RASVAHAPOISTA	8
I JOHDANTO	9
II KIRJALLISUUSTUTKIMUS	11
1 Mikrolevät	11
1.1 Kasvatusolosuhteiden vaikutus mikrolevien lipidipitoisuuteen ja rasvahappokoostumukseen.....	11
1.1.1 Lämpötila	12
1.1.2 Valo.....	12
1.1.3 Ravinteiden saanti.....	13
1.1.4 Hiilidioksidipitoisuus.....	14
1.1.5 Suolapitoisuus.....	14
1.1.6 Kasvatuksen vaihe	15
1.2 Mikrolevien pooliset lipidit.....	15
1.2.1 Glykolipidit.....	16
1.2.2 Fosfolipidit.....	17
1.2.3 Pooliset lipidit <i>E. gracilis</i> -levässä	18
2 Poolisten lipidien analysointi.....	18
2.1 Paineistettu nesteuutto.....	19
2.2 Erotus nestekromatografisesti	19
2.3 Tunnistus massaspektrometrisesti	22
2.3.1 Ionisaatio.....	22
2.3.2 Ionien analysointi.....	23
2.3.3 Detektointi	27
2.4 Kvantitointi ELSD-detektorilla	28
III KOKEELLINEN TUTKIMUS.....	29
1 Tutkielman kokeellisen osan tavoitteet	29
2 Tutkimuksen kulku	29
3 Näytteet ja standardit	30
4 Menetelmät	32
4.1 Paineistettu nesteuutto (ASE).....	32

4.2	Kiinteäfaasiuutto (SPE).....	32
4.3	Rasvahappojen metylointi ja määrittäminen kaasukromatografisesti (GC-FID)	33
4.4	Nestekromatografinen määrittäminen (LC-ELSD)	34
4.5	Massaspektrometrinen tunnistus (LC-MS)	35
5	Tulokset	36
5.1	Mikrolevänäytteiden ja SPE:llä erotettujen fraktioiden lipidipitoisuudet ja rasvahappokoostumukset	36
5.2	LC-ELSD-menetelmän kehitys ja optimointi	41
5.3	Standardien ja mikrolevänäytteiden MS-määrittäysten yhdisteet ja niiden msms-ionit	43
5.3.1	Standardien yhdisteet ja niiden msms-ionit	43
5.3.2	Mikrolevänäytteiden yhdisteet ja niiden msms-ionit.....	47
5.3.3	Poolisten lipidien rakenteiden ja rasvahappojen tunnistaminen MS-tulosten perusteella.....	50
5.4	Mikrolevänäytteiden poolisten lipidien profiilit LC-ELSD-määrittäyksellä	53
6	Pohdinta.....	57
6.1	Mikrolevien rasvahappokoostumus ja poolisten lipidien rasvahapot	58
6.2	Mikrolevien pooliset lipidiluokat	59
6.3	Tutkimuksen haasteita ja mahdollisia virhelähteitä	60
IV	PÄÄTELMÄT	61
	LÄHTEET	63
	LIITTEET	66
	Liite 1 <i>Selenastrum</i> sp. -mikrolevän rasvahappopitoisuudet	66
	Liite 2 <i>E. gracilis</i> -mikrolevän rasvahappopitoisuudet.....	67

LYHENTEET

APCI	Kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa
APPI	Fotoionisaatio ilmanpaineessa
ASE	Paineistettu nesteuutto
CI	Kemiallinen ionisaatio
CID-hajotus	Törmäyksen aiheuttama dissosiaatio
DGDG	Digalaktosyylidiasyyliglyseroli
EI	Elektroni-ionisaatio
ELSD	Valonsirontadetektori
ESI	Sähkösumutusionisaatio
FID	Liekki-ionisaatio detektori
GC	Kaasukromatografia
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia
MGDG	Monogalaktosyylidiasyyliglyseroli
MS	Massaspektrometria
PA	Fosfatidihappo
PC	Fosfatidyylikoliini
PE	Fosfatidyylietanolamiini
PG	Fosfatidyyliglyseroli
PI	Fosfatidyyli-inositoli
PS	Fosfatidyyliiseriini
SFE	Ylikriittinen hiilidioksidiuutto
SPE	Kiinteäfaasiuutto
SQDG	Sulfokvinovosyylidiasyyliglyseroli
TAG	Triasyyliglyseroli
TLC	Ohutkerroskromatografia

LISTAUS RASVAHAPOISTA

Lyhenne	Triviaalinimi	Systemaattinen nimi
12:0	lauriinihappo	dodekaanihappo
13:0	-	tridekaanihappo
14:0	myristiinihappo	tetradekaanihappo
15:0	-	pentadekaanihappo
16:0	palmitiinihappo	heksadekaanihappo
16:1, n-7	palmitoleiinihappo	cis-9-heksadekeenihappo
16:2, n-6	-	cis-7,10-heksadekadieeenihappo
16:3, n-3	-	cis-7,10,13-heksadekatrieenihappo
16:4, n-3	-	cis-4,7,10,13-heksadekatetraeenihappo
18:0	steariinihappo	oktadekaanihappo
18:1, n-9	öljyhappo	cis-9-oktadekeenihappo
18:1, n-7	vakseenihappo	trans-11-oktadekeenihappo
18:2, n-6	linolihappo	cis-9,12-oktadekadieeenihappo
18:3, n-3	α -linoleenihappo	cis-9,12,15-oktadekatrieenihappo
18:4, n-3	stearidonihappo	cis-6,9,12,15-oktadekatetraeenihappo
20:0	arakidihappo	eikosaanihappo
20:1, n-9		cis-11-eikosadieeenihappo
20:3, n-3		cis-11,14,17-eikosatrieenihappo
20:4, n-6	arakidonihappo	cis-5,8,11,14-eikosatetraeenihappo
20:5, n-3		cis-5,8,11,14,17-eikosapentaeenihappo
22:6, n-3		cis-4,7,10,13,16,19-dokosaheksaeenihappo

I JOHDANTO

Mikrolevät ovat yksisoluisia eukaryootti- tai prokaryoottiorganismeja, jotka sisältävät proteiineja, lipidejä, väriaineita, vitamiineja, antioksidanteja ja kivennäisaineita. Suuren ravintoarvonsa vuoksi mikroleviä on käytetty eläinten ja erityisesti kalojen rehuna. Jotkin mikrolevälajit sisältävät paljon rasvaa, minkä vuoksi mikrolevien sovelluksia biopolttoaineena on tutkittu paljon. Biopolttoaineen valmistus mikrolevien avulla ei ole kuitenkaan vielä taloudellisesti kannattavaa, sillä mikrolevien kasvatusta kaupallisessa laajuudessa on vielä toistaiseksi liian kallista verrattuna muihin polttoainelähteisiin (Milledge 2010). The European Algae Biomass Association -yhdistyksen mukaan vaaditaan 10–15 vuotta, jotta nykyiset laboratoriokokeilut muuttuvat teollisen mittakaavan polttoainetuotannoksi.

Mikrolevien koostumus vaihtelee suuresti lajista ja kasvatusolosuhteista riippuen. Mikrolevistä saatavia arvokkaita ravitsemuksellisesti hyödyllisiä yhdisteitä ovat proteiinit, peptidit, aminohapot, monityydyttymättömät rasvahapot, vitamiinit ja väriyhdisteet kuten klorofylli ja karotenoidit (Becker 2013). Karkeasti voidaan sanoa mikrolevien sisältävän proteiineja 25–63 % kuivapainosta, lipidejä 2–25 %, hiilihydraatteja 35–57 % ja kivennäisaineita 6–30 % (Spolaore ym. 2006, Becker 2007, Yao ym. 2015). Biopolttoaineeksi jalostetuissa kannoissa rasvapitoisuus voi olla jopa 85 % kuivapainosta (Mata ym. 2010). Triasyyliglyserolien (TAG) osuus kokonaisrasvasta on lajista riippuen 15–57 %, jopa 80 % (Bigogno ym. 2002, Breuer ym. 2012, Wang ja Wang 2012, Yao ym. 2015). Poolisten lipidien, kuten glyko- ja fosfolipidien, osuus kokonaisrasvasta on 0,7–37 % (Wang ja Wang 2012, Yao ym. 2015).

Mikrolevien ravintorikas koostumus on herättänyt kiinnostusta elintarvikesektorilla. Ensimmäiset kaupalliset mikrolevät olivat *Spirulina* ja *Chlorella*, joita seurasivat *Dunaliella salina* β -karoteenin tuotannossa 1980-luvulla ja *Haematococcus pluvialis* astaksantiinin tuotannossa 1990-luvulla (Borowitzka 2013). Tällä hetkellä *Cryptocodinium cohnii* -punalevän avulla tuotetaan dokosaheksaenihappoa, jota käytetään imeväisikäisten lisäravinteena (Jiang ym. 1999, Spolaore ym. 2006). Mikrolevistä saatujen valmisteiden etuna voidaan pitää sitä, että ne eivät ole eläinperäisiä tuotteita. Kuitenkin tällä hetkellä kala- ja lohiöljyt ovat taloudellisesta näkökulmasta huomattavasti parempia pitkäketjuisten

monityydyttymättömien rasvahappojen lähteitä. Myös muiden komponenttien kohdalla tilanne on tällä hetkellä vastaavanlainen, sillä monien kemiallisten yhdisteiden, esimerkiksi vitamiinien tai karotenoidien, valmistus levien avulla on kalliimpaa kuin valmistus kemiallisella synteesillä tai muiden organismien, kuten sienten tai bakteerien, avulla.

Tässä tutkimuksessa tutkittiin *Euglena gracilis* -silmälevää ja *Selenastrum* sp. -viherlevää. Mikrolevien sisältämä lipidimäärä, rasvahappokoostumus ja lipidien keskinäisten määrien suhde vaihtelevat suuresti kasvatusolosuhteista ja kasvatuksen vaiheesta riippuen (Regnault ym. 1995, Mahapatra ym. 2013, Anttila 2017). *Selenastrum* sp. -mikrolevän on havaittu sisältävän lähes 10 % kuivapainosta rasvahappoja (Anttila 2017, Immonen 2017). *E. gracilis* -mikrolevällä vaihtelu kasvatusolosuhteista ja kasvatuksen vaiheesta riippuen on havaittu olevan suurempaa kuin *Selenastrum* sp. -mikrolevällä. *E. gracilis* -mikrolevän rasvahappopitoisuus vaihtelee 0,3–1,0 %:n (Anttila 2017, Immonen 2017) ja 24 %:n (Mahapatra ym. 2015) välillä kasvatusolosuhteista riippuen. *E. gracilis* ja *Selenastrum* sp. -mikrolevien on havaittu sisältävän lähinnä tyydyttymättömiä rasvahappoja ja vallitsevia on havaittu olleen 16- ja 18-hiiliketjuiset rasvahapot (Regnault ym. 1995, Mahapatra ym. 2013, Immonen 2017). *E. gracilis* -mikrolevän lipidien on havaittu jakaantuvan siten, että neutraalilipidejä, galaktolipidejä ja fosfolipidejä on kutakin noin kolmasosa lipidimäärästä, mutta näidenkin osuudet vaihtelevat suuresti kasvatusolosuhteista riippuen (Regnault ym. 1995). *Selenastrum* sp. -mikrolevän lipidiluokkien osuuksista on niukasti tietoa saatavilla. Helsingin yliopistossa aiemmin tehdyissä tutkimuksissa on selvitetty *E. gracilis* ja *Selenastrum* sp. -mikrolevien kemiallista koostumusta ja lipidien rasvahappokoostumusta (Anttila 2017, Immonen 2017, Tossavainen 2018), mutta mikrolevien sisältämiä poolisia lipidiluokkia ja luokkien rasvahappokoostumusta ei ole tutkittu. Aiempien tutkimusten perusteella voidaan kuitenkin olettaa *E. gracilis* ja *Selenastrum* sp. -mikrolevissä olevan merkittäviä määriä poolisia lipidejä.

Tämän tutkielman tavoitteena oli syventyä *E. gracilis* ja *Selenastrum* sp. -mikrolevien poolisiin lipideihin ja poolisten lipidien analytiikkaan. Kirjallisuustutkimuksen tavoitteena oli selvittää, kuinka kasvatusolosuhteet vaikuttavat mikrolevien lipidipitoisuuteen ja -koostumukseen. Lisäksi tavoitteena oli selvittää lipidianalytiikan perusteita. Kokeellisen tutkimuksen tavoitteena oli luokitella mikrolevien sisältämät lipidit poolisuuden mukaan selvittäen osuudet rasvahappokoostumuksen perusteella. Lisäksi tavoitteena oli kehittää

nestekromatografinen menetelmä (HPLC) mikrolevien fosfo- ja glykolipidien määrittämiseen. Kehitetyllä nestekromatografia-valonsironta-menetelmällä (LC-ELSD) tutkittiin *E. gracilis* ja *Selenastrum* sp. -mikrolevänäytteiden poolisia lipidiluokkia. Mikrolevänäytteissä esiintyvät fosfo- ja glykolipidit tunnistettiin nestekromatografia-massaspektrometrisesti (LC-MS).

II KIRJALLISUUSTUTKIMUS

1 Mikrolevät

1.1 Kasvatusolosuhteiden vaikutus mikrolevien lipidipitoisuuteen ja rasvahappokoostumukseen

Mikrolevien lipidipitoisuus ja -koostumus vaihtelevat kasvatusolosuhteista riippuen. Vaikuttavia kasvatusolosuhteita ovat lämpötila, valo, ravinteiden saanti, hiilidioksidipitoisuus ja suolapitoisuus. Lisäksi lipidipitoisuuteen ja -koostumukseen vaikuttaa, missä kasvuvaiheessa mikroleväkasvusto on, kun se kerätään. Optimoimalla kasvatusolosuhteita voidaan mikrolevät saada tuottamaan halutun määrän ja haluttuja rasvahappoja. Lämpötila vaikuttaa rasvahappokoostumukseen: matalassa lämpötilassa rasvahapot olivat tyydyttymättömpiä ja korkeassa lämpötilassa tyydyttyneempiä (Converti ym. 2009, Craig ym. 2015). Valo vaikuttaa sekä lipidipitoisuuteen että -koostumukseen siten, että valossa kasvaneilla mikrolevillä lipidipitoisuus oli suurempi ja lipidit sisälsivät enemmän tyydyttymättömiä rasvahappoja, kun taas pimeässä kasvaneilla lipidipitoisuus oli pienempi ja lipidit sisälsivät enemmän tyydyttyneitä rasvahappoja (Schwarzthans ym. 2015, Zeng ym. 2016). Rajoitettu ravinteiden saanti lisäsi mikrolevien lipidipitoisuutta ja muutti lipidiluokkien osuuksia siten, että rajoitetussa typen saannissa mikrolevät tuottivat enemmän neutraalilipidejä ja rajoittamattomassa typen saannissa enemmän fosfo- ja glykolipidejä (Regnault ym. 1995, Breuer ym. 2012, Griffiths ym. 2012, Martin ym. 2014). Kasvatusalustan hiilidioksidi- ja suolapitoisuudet vaikuttivat mikrolevien lipidipitoisuuteen ja lipidien rasvahappokoostumukseen (Roncarati ym. 2004, Takagi ym. 2006, Mudimu ym. 2015). Stationääriseen kasvun vaiheeseen mikrolevien kokonaislipidimäärä oli suurempi ja TAG:a oli eniten, kun taas eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen kokonaislipidimäärä oli pienempi ja TAG:a ja galaktolipidejä oli saman verran (Bigogno ym. 2002, Mudimu ym. 2015, Zeng ym. 2016). Seuraavissa kappaleissa kasvatusolosuhteiden vaikutuksia käsitellään tarkemmin.

1.1.1 Lämpötila

Converti ym. (2009) tutkivat lämpötilan vaikutusta mikrolevien kasvuun, lipidipitoisuuteen ja -koostumukseen. *Nannochloropsis* -lajille tutkittavat lämpötilat olivat 15, 20 ja 25 °C ja *Chlorella vulgaris* -lajille 25, 30, 35 ja 38 °C. Kasvu oli tehokkainta lajin optimilämpötilassa. Lämpötilan laskeminen nosti lipidien määrää. Lipidien kokonaistuotanto ei kuitenkaan kasvanut alemmassa lämpötilassa, sillä vaikka lipidien kokonaispitoisuus kasvoi, biomassan määrä oli pienempi. Rasvahappokoostumus vaihteli lämpötilan mukaan. Kun lämpötilaa nostettiin, öljyhapon osuus kasvoi ja palmitiini- ja steariinihappojen osuudet laskivat. Linolihappo- ja α -linoleenihappomäärät olivat matalissa lämpötiloissa suurempia kuin korkeissa lämpötiloissa. Myös Craig ym. (2015) havaitsivat, että matalammassa lämpötilassa rasvahapot olivat tyydyttymättömpiä kuin korkeammassa lämpötilassa. He tutkivat monogalaktoosyylidiasyyliglyseroliin (MGDG) liittyneitä rasvahappoja ja havaitsivat, että 20 °C:ssa 18:3/16:4 (sn 1/sn 2) MGDG oli yleinen, kun taas 30 °C:ssa 18:2/16:2-MGDG.

1.1.2 Valo

Kokonaislipidipitoisuus on suurempi valossa kasvaneilla mikrolevilla kuin pimeässä kasvaneilla (Schwarzthans ym. 2015, Zeng ym. 2016). *E. gracilis* -mikrolevällä kokonaislipidipitoisuus valossa oli 20 % ja pimeässä 11 % (Schwarzthans ym. 2015). Myös rasvahappojen tyydyttyneisyysaste vaihtelee valon mukaan. Zengin ym. (2016) mukaan valossa kasvaneilla kasvustoilla suurin rasvahappoluokka oli monitydyttymättömät rasvahapot (70 % rasvahapoista), kun taas pimeässä kasvaneissa kasvustoissa eniten oli tyydyttyneitä rasvahappoja (65 % rasvahapoista). Kertatyydyttymättömien rasvahappojen pitoisuus oli molemmissa kasvatusolosuhteissa pienin. Valossa kasvaneilla kasvustoilla heksadekadienihappo-, heksadekatrieenihappo-, heksadekatetraeenihappo- ja α -linoleenihappopitoisuudet olivat huomattavasti suurempia kuin pimeässä kasvaneilla. Pimeässä kasvaneilla sen sijaan lauriinihappo-, tridekaanihappo-, myristiinihappo- ja palmitiinihappopitoisuudet olivat suurempia. Dokosaheksaenihappopitoisuus oli suurempi valossa kasvaneilla kasvustoilla. Suurin eikosapentaenihappopitoisuus havaittiin pimeässä kasvaneilla kasvustoilla kasvun loppuvaiheessa. Valoisassa eikosapentaenihappopitoisuus oli lähes sama kuin pimeässä kasvaneilla, mutta valoisassa pitoisuus pysyi samana kasvun vaiheesta riippumatta.

1.1.3 Ravinteiden saanti

Rajoitetun ravinteiden saannin on todettu lisäävän mikrolevien lipidipitoisuutta. Rajoitettu typen saanti lisäsi erityisesti TAG:n pitoisuutta, kun taas rajoittamaton typen saanti lisäsi poolisten lipidien pitoisuutta. Griffiths ym. (2012) tutkivat yhdentoista eri mikrolevälajin lipidipitoisuutta, kun typen määrää kasvatusliemessä oli rajoitettu tai sitä oli ylimäärin. Kun typpeä oli ylimäärin, kasvatusliemen typpipitoisuus oli 1500 mg/l. Typen määrältään rajoitetussa kasvatusliemessä typpeä oli 150 mg/l. Yhdestätoista lajista kymmenen tuotti enemmän lipidejä rajoitetussa typensaannissa. Rasvahappokoostumus vaihteli typen saannin mukaan. Esimerkiksi *Nannochloropsis*-lajilla rajoitetussa typen saannissa öljyhappopitoisuus suureni ja myristiinihappo-, palmitiinihappo- ja eikosapentaeeni-happopitoisuudet pienenivät verrattuna rajoittamattomaan typensaantiin. Myös Breuer ym. (2012) ja Converti ym. (2009) havaitsivat, että rajoitetulla typen saannilla lipidien tuotanto lisääntyi. Öljyhapon osuus oli suurempi, kun typpeä ei ollut saatavilla (Breuer ym. 2012). Monityydyttymättömien rasvahappojen pitoisuus laski, kun typpeä ei ollut saatavilla. Kuitenkin määrällisesti kaikkien rasvahappojen tuotto lisääntyi, kun typpeä ei ollut saatavilla, sillä biomassan kasvu oli suurta.

Martin ym. (2014) tutkivat typen määrän vaikutusta lipidiluokkien pitoisuuksiin *Chlorella* ja *Nannochloropsis*-lajeilla. Kun typpeä oli ylimäärin saatavilla, sekä galakto- että fosfolipidien pitoisuus oli suurempi kuin silloin, kun typensaanti oli rajoitettua. Fosfatidyyliglyseroli (PG) oli poolisista lipideistä ainut, jonka määrä kasvoi rajoitetussa typensaannissa. On kuitenkin huomioitava, että sen pitoisuus oli alunperin pieni. Rajoitetussa typensaannissa TAG-pitoisuus oli suurin. TAG:n kasvun katsottiin olevan yhteydessä fosfo- ja galaktolipidien vähentymiseen. Fosfo- ja galaktolipidien vähentymisen katsottiin edelleen olevan yhteydessä typensaantiin, sillä rajoitetussa typensaannissa typpeä sisältävien poolisten lipidien, kuten fosfatidyylietanolamiinin (PE) ja fosfatidyylikoliinin (PC), synteesi on rajoitettua. Myös Breuer ym. (2012) katsoivat fosfolipidien vähentymisen johtuvan vähentyneestä typensaannista. Lisäksi MGDG:n on havaittu olevan riippuvainen typensaannista (Regnault ym. 1995).

Regnault ym. (1995) tutkivat hiilen ja typen vaikutusta lipideihin. He havaitsivat, että kun hiiltä oli saatavilla, mutta ei typpeä, mikrolevät käyttivät hiiltä rasvahappojen valmistukseen.

Hiilen ja typen saanti vaikutti rasvahappojen tyydyttyneisyysasteeseen. Rasvahapot olivat tyydyttyneimpiä, kun saatavilla oli hiiltä mutta ei typpeä, ja tyydyttymättömiä, kun saatavilla oli typpeä mutta ei hiiltä. Kun typpeä ei ollut saatavilla, neutraalilipidien osuus kasvoi ja poolisten laski. MGDG-pitoisuus oli suurin, kun saatavilla oli typpeä mutta ei hiiltä. Typen tai hiilen saatavuudella ei ollut vaikutusta digalaktosyylidiasyyli-glyserolipitoisuuteen (DGDG) tai PC-pitoisuuteen.

1.1.4 Hiilidioksidipitoisuus

Hiilidioksidi on mahdollinen hiilen lähde mikrolevien tuotannossa. Hiilidioksidin hyödyntäminen tällä tavoin biomassan ja hyödyllisten komponenttien valmistukseen olisi hyvä keino vähentää päästöjä ja hillitä ilmastonmuutosta. Kokonaislipidimäärän on havaittu olevan suurempi, kun kasvatukseen kuplitetaan 5/95-hiilidioksidi-ilma-seosta verrattuna 15/85-hiilidioksidi-ilma-seokseen tai pelkkään ilmaan (Mudimu ym. 2015). Hiilidioksidipitoisuus vaikuttaa myös rasvahappokoostumukseen. Roncarati ym. (2004) havaitsivat, että kasvuston eksponentiaalisen kasvun vaiheessa suuri hiilidioksidipitoisuus lisäsi pitkäketjuisten monitydyttymättömien rasvahappojen pitoisuutta ja laski lyhytketjuisten tyydyttyneiden rasvahappojen pitoisuutta. Pienessä hiilidioksidipitoisuudessa sen sijaan pitkäketjuisten monitydyttymättömien rasvahappojen pitoisuus oli pieni ja lyhytketjuisten rasvahappojen pitoisuus suuri. Myös stationäärivaiheessa havaittiin pienen hiilidioksidipitoisuuden laskevan pitkäketjuisten monitydyttymättömien ja lisäävän lyhytketjuisten rasvahappojen määrää, mutta stationäärivaiheessa ero ei ollut yhtä selkeä kuin eksponentiaalisen kasvun vaiheessa.

1.1.5 Suolapitoisuus

Kasvatusliemen suolapitoisuus voi vaikuttaa mikrolevien kasvuun ja lipidikoostumukseen. Takagi ym. (2006) tutkivat suolapitoisuuden vaikutusta *Dunaliella tertiolecta* -merilevällä. Lipidien kokonaismäärässä ja TAG:n määrässä havaittiin merkittävä ero eri suolapitoisuuksilla. Kun suolapitoisuus oli 0,5 mol/l, lipidipitoisuus oli 60 % kuivapainosta. Sen sijaan suolapitoisuudessa 1,0 mol/l lipidipitoisuus oli 67 %. TAG-pitoisuus 0,5-molaarisessa kasvatusliemessä oli 40 % kokonaislipidimäärästä ja 1,0-molaarisessa 56 % kokonaislipidimäärästä. Lipidien ja TAG:n pitoisuus oli suurempi 1-molaarisessa

kasvatusliemessä. Kasvustojen kasvuvauhdissa tai typen kulutuksessa ei ollut eroa eri suolapitoisuuksilla.

1.1.6 Kasvatuksen vaihe

Mikrolevien kasvatus koostuu mikrobien tapaan eksponentiaalisen kasvun vaiheesta ja stationäärivaiheesta. Kasvuston rasvahappopitoisuus ja -koostumus vaihtelevat sen mukaan, missä kasvatuksen vaiheessa mikroleväkasvusto kerätään. Kokonaislipidimäärä on suurempi stationäärivaiheessa kuin eksponentiaalisen kasvun vaiheessa (Bigogno ym. 2002, Mudimu ym. 2015, Zeng ym. 2016). Eksponentiaalisen kasvun vaiheessa TAG:a ja galaktolipidejä oli suunnilleen saman verran (43 ja 40 % kokonaislipidimäärästä), kun taas stationäärivaiheessa TAG:n määrä kasvoi ja galaktolipidien määrä pieneni (77 ja 15 % kokonaislipidimäärästä) (Bigogno ym. 2002). Rasvahappokoostumuksessa voi esiintyä monenlaisia muutoksia eksponentiaalisen kasvun vaiheen ja stationäärivaiheen välillä. Eksponentiaalisen kasvun vaiheessa lyhytketjuisten tyydyttyneiden rasvahappojen pitoisuus oli suuri ja monityydyttymättömien rasvahappojen pitoisuus pieni (Roncarati ym. 2004). Bigogno ym. (2002) havaitsivat saman muutoksen rasvahappokoostumuksessa. He tutkivat rasvahappokoostumuksen muutoksia poolisissa lipideissä. Galaktolipidien rasvahappokoostumus muuttui eksponentiaalisen kasvun ja stationäärivaiheen välillä. Eksponentiaalisen kasvun vaiheessa galaktolipideissä oli paljon α -linoleenihappoa ja heksadekatrieenihappoa, jotka muuttuivat stationäärivaiheessa linolihapoksi ja heksadekatetraeenihapoksi. Fosfolipideissä eksponentiaalisen kasvun vaiheessa havaittiin paljon arakidonihappoa ja stationäärivaiheessa linolihappoa ja vakseenihappoa. TAG:lla ei havaittu yhtä suurta muutosta rasvahappokoostumuksessa kuin poolisissa lipideissä. Muutokset rasvahappokoostumuksessa eksponentiaalisen kasvun vaiheen ja stationäärivaiheen välillä ovat kuitenkin lajista riippuvaisia, sillä Griffiths ym. (2012) eivät havainneet muutoksia rasvahappokoostumuksessa tutkimissaan 11 mikrolevälajissa 14 päivän kasvun eri vaiheissa.

1.2 Mikrolevien pooliset lipidit

Pooliset lipidit eli fosfo- ja glykolipidit ovat tärkeä rakenneosa biologissa kalvoissa. Fosfo- ja glykolipideillä on sekä hydrofobinen että hydrofiilinen osa, joiden avulla ne muodostavat kaksikerroksisia kalvorakenteita. Fosfo- ja glykolipidien pitoisuudella ja niihin liittyneiden

rasvahappojen koostumuksella on suuri vaikutus kalvon stabiilisuuteen ja toimivuuteen. Fosfolipidejä ovat PG, PC, PE, fosfatidyyliiseriini (PS), fosfatidyyli-inositoli (PI) ja fosfatidihappo (PA). Glykolipidejä ovat MGDG, DGDG ja sulfokvinovosyyli-diasyyliglyseroli (SQDG). Fosfo- ja glykolipidien lisäksi on myös poolisia betaiinilipidejä, joiden sn 3 asemassa on erilaisia betaiini- eli trimetyyliyglysiinijohdannaisia. Betaiinilipidien varaus muuttuu pH:n vaikutuksesta kvaternääriseen ammoniumionin vuoksi.

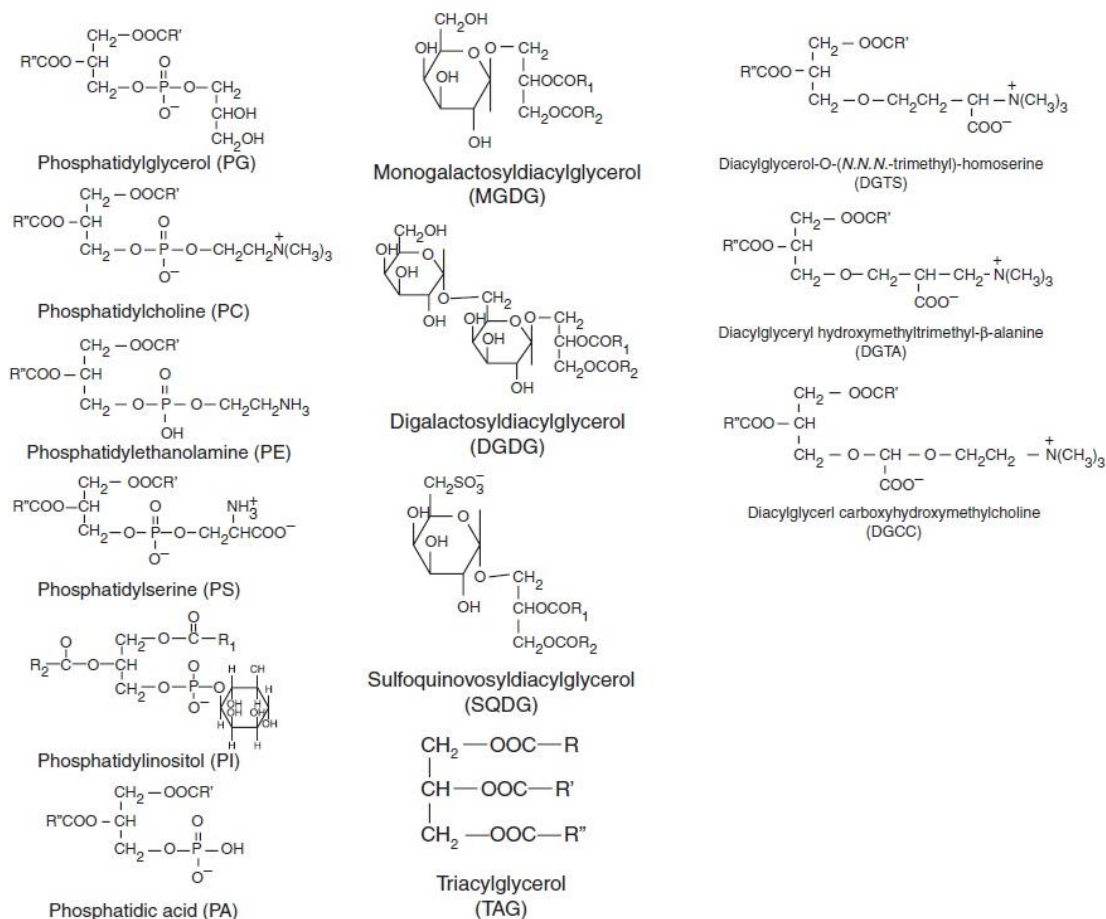
Poolisten lipidiluokkien osuudet mikrolevissä vaihtelevat lajin mukaan. Esimerkiksi Wang ja Wang (2012) tutkivat *Nannochloropsis* sp. ja *Schizochytrium limacinum* -lajien lipidiluokkien ja poolisten lipidien osuuksia. *Nannochloropsis* sp. sisälsi poolisia lipidejä 37 % kokonaislipidimäärästä. Poolisista lipideistä suurin osa oli fosfolipidejä (44,7 % poolisista lipideistä). Glykolipidejä oli 37,1 % poolisista lipideistä. Fosfolipidiluokkien osuudet *Nannochloropsis* sp. -lajilla olivat PC 18,1 %, PI 16,7 %, PG 6,0 % ja PE 3,9 % ja glykolipidiluokkien osuudet DGDG 28,4 %, steryyliyglykosidi 6,6 % ja MGDG 2,1 %. *Schizochytrium limacinum* sisälsi poolisia lipidejä 14 % kokonaislipidimäärästä, joista suurin osa oli PE:a (49,5 % poolisista lipideistä) ja PC:a (35,4 %). MGDG-pitoisuus oli 9,7 %, steryyliyglykosidipitoisuus 4,0 %, PG-pitoisuus 0,8 % ja DGDG-pitoisuus 0,6 %.

1.2.1 Glykolipidit

Yleisimmät glykolipidit mikrolevissä ovat galaktolipidit MGDG ja DGDG. Galaktolipideissä glyserolirunkoon on liittynyt yksi tai kaksi rasvahappoa sn 1 ja sn 2 asemaan ja galaktoosi sn 3 asemaan β -glykosidisidoksella (kuva 1). MGDG:ssa on nimensä mukaisesti yksi galaktoosi-molekyyli. DGDG:ssa kaksi galaktoosi-molekyyliä on liittynyt 1 \rightarrow 6-glykosidisidoksella toisiinsa. MGDG muodostaa yleensä muita kuin kaksikerroksisia kalvorakenteita, kuten muutkin glykolipidit, joissa on vain yksi sokerimolekyyli sn 3 asemassa, toisin kuin DGDG, joka muodostaa aina kaksikerroksisen kalvon (Hölzl ja Dörmann 2007). MGDG ja DGDG toimivat solun fotosynteesissä, ja niiden epäillään olevan välttämätön osa fotosynteesiä. Niiden tehtäviksi on arveltu tylakoidi-kalvon ylläpitäminen optimaalisena ja fotosynteesiin liittyvien proteiinien kanssa vuorovaikutus (Hölzl ja Dörmann 2007). MGDG:a on lähes yksinomaan kloroplastin sisällä tylakoidi-kalvoissa, mutta DGDG:a on tylakoidi-kalvojen lisäksi kloroplastin ulkokalvossa.

1.2.2 Fosfolipidit

Fosfolipideissä glyserolirunkoon on liittynyt yksi tai kaksi rasvahappoa sn 1 ja sn 2 asemiin ja fosfaattiryhmä sn 3 asemaan. Fosfaattiryhmään on liittynyt erilaisia hydrofiilisiä ryhmiä. PG:ssa fosfaattiryhmään on liittynyt glyseroli, PC:ssa koliini, PE:ssa etanolamiini, PS:ssa seriini ja PI:ssa myo-inositoli (kuva 1). Fosfolipidit sijaitsevat solun kloroplastissa, jossa ne muodostavat kloroplastin ulkokalvon. PG:a on ulkokalvon lisäksi paljon kloroplastin sisällä tylakoidi-kalvoissa (Hölzl ja Dörmann 2007).



Kuva 1. Poolisten lipidien rakenteet (Kumari ym. 2013). Kaikkien yhdisteiden perusrakenteena on glyserolirunko, jonka sn 1 ja sn 2 asemiin on kiinnittynyt rasvahappo. Sn 3 asemaan on kiinnittynyt yhdisteestä riippuen vaihteleva hydrofiilinen osa.

1.2.3 Pooliset lipidit *E. gracilis* -levässä

E. gracilis sisälsi neutraalilipidejä, galaktolipidejä ja fosfolipidejä kutakin noin kolmanneksen lipidimäärästä (Regnault ym. 1995). *E. gracilis* -mikrolevässä suurin poolisten lipidien luokka oli MGDG (37,0 %) (Kaoua ja Laval-Martin 1995, Ogawa ym. 2014). Kaouan ja Laval-Martinin (1995) mukaan seuraavaksi suurimmat poolisten lipidien luokat olivat PC (24,4 %), DGDG (17,3 %), PE (11,6 %), PG (6,7 %) ja SQDG (3,0 %). Ogawan ym. (2014) mukaan sen sijaan *E. gracilis* sisälsi MGDG:n jälkeen toiseksi eniten PE:a, kolmanneksi eniten sfingomyeliinia ja lisäksi pieniä määriä lysoPC:a, lysoPE:a, PA:a ja PC:a.

MGDG ja DGDG sisältävät yleensä mikrolevissä 16- ja 18-hiiliketjuisia rasvahappoja. Näin on havaittu olevan myös *E. gracilis* -mikrolevällä (Kaoua ja Laval-Martin 1995, Regnault ym. 1995, Craig ym. 2015). Craig ym. (2015) kuitenkin havaitsivat myös 20-hiiliketjuisia rasvahappoja. MGDG sisälsi *E. gracilis* -mikrolevällä eniten α -linoleenihappoa ja heksadekatetraeenihappoa (Kaoua ja Laval-Martin 1995, Regnault ym. 1995, Craig ym. 2015). Craigin ym. (2015) mukaan myös DGDG sisälsi eniten α -linoleenihappoa ja heksadekatetraeenihappoa, mutta Kaoua ja Laval-Martin (1995) havaitsivat DGDG:n sisältävän eniten α -linoleenihappoa ja heksadekadieenihappoa. Monityydyttymättömät 18- ja 20-hiiliketjuiset rasvahapot olivat *E. gracilis* -mikrolevässä useimmiten sn 1 asemassa ja monityydyttymättömät 16-hiiliketjuiset rasvahapot sn 2 asemassa (Craig ym. 2015). PG sisälsi eniten palmitoleiinihappoa ja toiseksi eniten linolihappoa, SQDG sisälsi selkeästi eniten palmitiinihappoa ja vain pieniä määriä muita rasvahappoja (Kaoua ja Laval-Martin 1995).

2 Poolisten lipidien analysointi

Lipidien analysoinnissa voidaan käyttää useita eri tekniikoita, kuten ohutkerroskromatografiaa (thin layer chromatography, TLC), nestekromatografiaa yhdistettynä massaspektrometriaan (LC-MS), diodirividetektoriin (diode array detector, LC-DAD) tai ELSD-detektoriin, ydinmagneettista resonanssispektroskopiaa (nuclear magnetic resonance, NMR), kaasukromatografiaa (gas chromatography, GC) yhdistettynä massaspektrometriaan (GC-MS) tai liekki-ionisaatio detektoriin (flame ionization detector

(GC-FID). Tässä luvussa on keskitytty tutkielman kannalta olennaisiin tekniikoihin: paineistettuun nesteuuttoon (accelerated solvent extraction, ASE), LC:aan ja MS:aan.

2.1 Paineistettu nesteuutto

Lipidien uuttamiseen mikrolevistä voidaan käyttää ASE-uuttoa. ASE-uutto on melko nopea uuttomenetelmä eikä se vaadi paljon työtä. Lisäksi ASE-uuton etuna on, että uutossa ei tarvitse käyttää terveydelle haitallisia liuottimia. Saanto on vastaava kuin perinteisillä uuttomenetelmillä. Anttila (2017) tutki lipidien uuttamista ASE-uutolla *E. gracilis* ja *Selenastrum* sp. -mikrolevistä. Anttila tutki uuttotehokkuutta eri uuttoliuottimilla (2-etoksietanoli, asetoni, etanoli), eri lämpötiloilla (75 °C, 100 °C, 125 °C), eri uuttoaajoilla (4 min, 12 min, 20 min) sekä eri uuttokertojen lukumäärällä (1, 2, 3). Uuttotehokkuus oli paras, kun käytettiin etanolia ja lämpötila oli 125 °C, uuttoaika oli 11 min, uuttokertoja oli yksi ja paine oli 1500 psi.

Herrero ym. (2005) tutkivat ASE-uuton soveltamista *Spirulina platensis* -mikrolevälle. Tutkittavina uuttoliuottimina oli heksaani, petrolieetteri, etanoli ja vesi. Parhaimmaksi liuottimeksi valikoitui etanoli sen GRAS-luonteen vuoksi sekä parhaimman saannon vuoksi. Testatut uuttolämpötilat olivat 60, 115 ja 175 °C ja testatut uuttoaajat olivat 3, 9 ja 15 min. Optimilämpötilan havaittiin olevan riippuvainen liuottimen poolisuudesta: mitä poolisempi oli liuotin, sitä korkeampi lämpötila oli optimaalisin. Uuttoaajalla ei havaittu kovin suurta merkitystä.

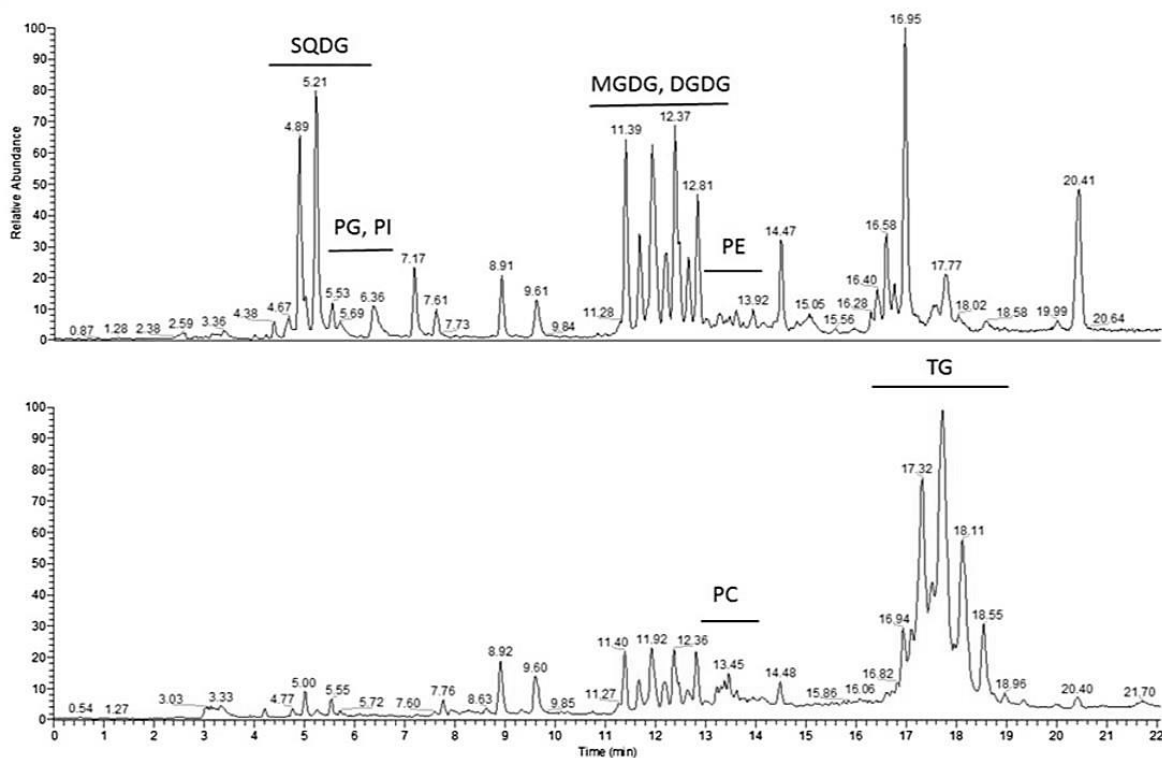
2.2 Erotus nestekromatografisesti

Lipidien analysoinnissa käytetään sekä normaali- että käänteisfaasikromatografiaa. Normaalfaasikromatografiassa lipidien erotus perustuu erilaisiin poolisiin ryhmiin, kun taas käänteisfaasikromatografiassa erotus perustuu eroihin asyyliketjujen pituudessa ja tyydyttyneisyydessä (Cajka ja Fiehn 2014). Poolisten yhdisteiden analysoinnissa käytetään yleensä normaalifaasikromatografiaa. Viime aikoina normaalifaasikromatografian vaihtoehtona poolisten yhdisteiden analytiikassa on yleistynyt hydrofiilinen-vuorovaikutus-kromatografia, jonka toistettavuus ja sopivuus massaspektrometrin kanssa ovat parempia kuin normaalifaasikromatografian (Anesi ja Guella 2015). Mikrolevien lipidiluokkien

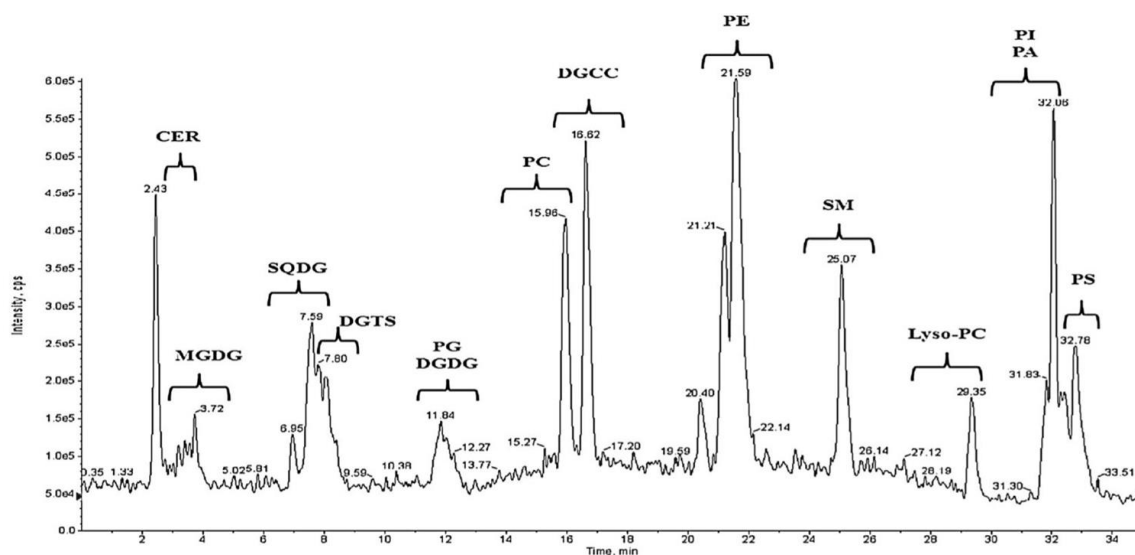
erottamiseen on käytetty normaalifaasikromatografiaa ja dioli- tai bifenyylisolonnia (Anesi ja Guella 2015, Cutignano ym. 2016). Muita lipidiluokkien erottamiseen yleisesti käytettyjä kolonneja ovat silika-, syano- ja aminokolonit (Lin 2005).

Lipidiluokkien kromatografisessa erotuksessa käytetään gradienttia, sillä poolisuudeltaan hyvin erilaisten lipidien, kuten poolittoman TAG:n ja poolisen lyso-PC:n, eluoituminen samalla liuottimella on mahdotonta. Poolittomien ja poolisten lipidiyhdisteiden hyvä erottuminen on haastavaa saavuttaa yhdellä ajo-ohjelmalla. Helpompaa on erottaa vain yhden lipiluokan yhdisteet, kuten vain fosfolipidit. Gradientin ajoliuoksina poolisille yhdisteille on käytetty silika-kolonnille esimerkiksi A: heksaania/heptaania, B: isopropanolia ja C: vettä tai dioli-kolonnille esimerkiksi A: heksaanin/heptaanin, isopropanolin ja etikkahapon seosta ja B: isopropanolin, veden ja etikkahapon seosta (Lin 2005). Etikkahapon käyttäminen ajoliuosseoksissa lisää molekyyli-ionin voimakkuutta PC:lla, PE:lla ja PS:lla (Brügger ym. 1997).

Cutignano ym. 2016 määrittivät mikrolevisä esiintyviä poolisia lipidejä LC-MS-tekniikalla. He käyttivät bifenyylisolonnia ja gradienttiohjelman ajoliuoksina olivat A: vesi ja B: metanoli. Kyseisen kromatografian *Cyclotella cryptica* -mikrolevän LC-MS-kromatogrammit ESI-MS⁻ ja ESI-MS⁺-ionisaatioilla on kuvassa 2. Anesi ja Guella (2015) kehittivät nopean LC-menetelmän membraanilipidien määrittämiseen. He testasivat menetelmää mikrolevänäytteillä. He käyttivät diolikolonnia ja gradienttiohjelman ajoliuoksina olivat A: asetonitriili ja vesi ja B: vesi. Menetelmällä kyettiin erottamaan 14 lipidiluokkaa (kuva 3).



Kuva 2. *Cyclotella cryptica* -mikrolevän poolisten lipidien LC-MS-kromatogrammi ESI-MS⁻ (ylhäällä) ja ESI-MS⁺ (alhaalla) ionisaatioilla (Cutignano ym. 2016). Cutignano ym. (2016) käyttivät bifenyylisolonia ja ajoliuoksina olivat A:vesi ja B:metanoli.



Kuva 3. Poolisten lipidien standardien LC-MS-kromatogrammi (Anesi ja Guella 2015). Anesi ja Guella (2015) käyttivät diolisolonia ja ajoliuoksina olivat A:asetonitrili ja vesi ja B: vesi.

2.3 Tunnistus massaspektrometrisesti

Massaspektrometriassa on kolme päätapautumaa: ionisaatio, ionien analysointi ja detektointi. Ionisaatiossa varauksettomat molekyylit ionisoidaan joko positiivisesti tai negatiivisesti varautuneiksi ioneiksi. Muodostuneet ionit analysoidaan ja erotetaan massa/varaus -suhteen perusteella ja mitataan erilaisilla detektoreilla kvalitatiivisesti tai kvantitatiivisesti.

2.3.1 Ionisaatio

Ionisaatiotekniikoita on useita. Elektroni-ionisaatio (electron ionisation, EI), kemiallinen ionisaatio (chemical ionisation, CI) sekä ilmanpaineessa tapahtuvat ionisaatiotekniikat sähkösumutus-ionisaatio (electrospray ionisation, ESI), kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa (atmospheric pressure chemical ionisation, APCI) ja fotoionisaatio ilmanpaineessa (atmospheric pressure photoionisation, APPI) perustuvat eri ilmiöihin ja soveltuvat eri yhdisteille. ”Kovat” ionisaatiotekniikat, kuten EI, eivät sovellu lipidien ionisoitiin, sillä ne aiheuttavat liikaa hajoamista ja näin ollen ei saada aikaan molekyylimonia. Sen sijaan ”pehmeät” ionisaatiotekniikat, kuten CI, ESI ja APCI, soveltuvat lipidien ionisointiin hyvin, sillä ne tuottavat molekyylimonia eivätkä tutkittavat yhdisteet hajoa liikaa (Cui ja Thomas 2009). Tämän vuoksi ”pehmeät” ionisaatiotekniikat ovat tärkeitä lipidianalytiikassa. Ilmanpaineessa tapahtuvien ionisaatiotekniikoiden etuna on, että ne soveltuvat nestekromatografian ja massaspektrometrin yhdistämiseen. Lipidianalytiikassa EI ja CI ionisaatioita hyödynnetään kaasukromatografiassa.

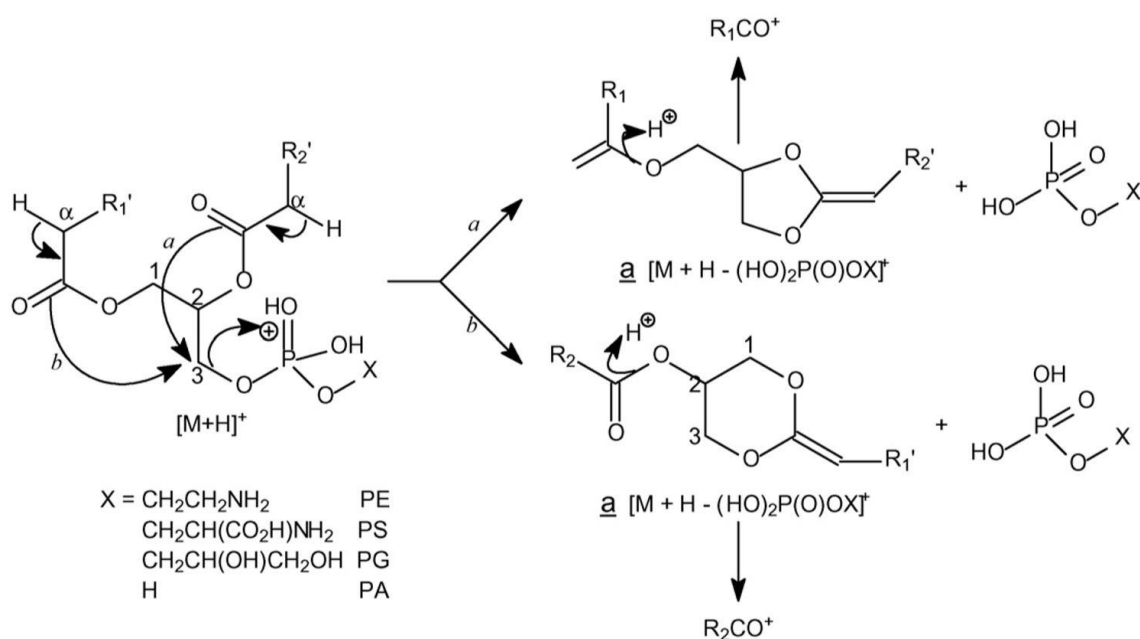
Vaikka fosfolipidit voidaan ionisoida ESI:lla sekä positiivisiksi että negatiivisiksi ioneiksi, erilaiset pooliset ryhmät voivat suosia toista ionisaatiomuotoa. PC suosii positiivista ionisaatiota, kun taas PG, PS ja PI suosivat negatiivista ionisaatiota (Murphy ja Axelsen 2011). PE:lle sopii sekä positiivinen että negatiivinen ionisaatio (Murphy ja Axelsen 2011). On kuitenkin tärkeää, että kaikkia fosfolipidiluokkia voidaan tutkia positiivisella ionisaatiolla, koska tandemmassaspektrometrillä fosfolipidien karakteristinen ryhmä voidaan selvittää positiivisen ionisaation avulla (Murphy ja Axelsen 2011).

2.3.2 Ionien analysointi

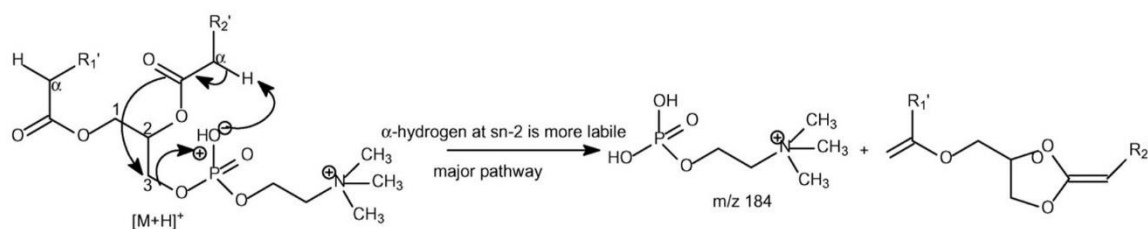
Ionit analysoidaan ja erotetaan massa-analysaattorilla. Erotus voi perustua lentoaikaan, magneettikenttään tai sähkökenttään, joissa massa/varaus -suhteeltaan erilaiset ionit käyttäytyvät eri tavalla. Erilaisia massa-analysaattoreita ovat mm. kvadrupoli-, kvadrupoli-ioniloukku-, lentoaikamassa-, fourier-muunnosionisyklotroniresonanssi- ja orbiloukku-analysaattori. Kvadrupolianalysaattori on yleinen ja edullinen ja soveltuu hyvin ESI:n, APCI:n ja APPI:n kanssa käytettäväksi. Kvadrupolianalysaattoriin voi olla yhdistettynä myös ioniloukku, jolloin loukkuun voidaan sulkea valittuja ioneja edelleen tutkittavaksi. Ionit voidaan hajottaa fragmenteiksi (collision activated dissociation, CID), minkä jälkeen fragmentit määritetään toisella massa-analysaattorilla. Näin ionien rakenteesta saadaan tietoa. Kun CID-hajotus tehdään muodostaen positiivisesti varautuneita ioneja, saadaan selville lipidin pooliseen ryhmään liittyviä rakenteita (Murphy ja Axelsen 2011). Kun CID-hajotus tehdään muodostaen negatiivisesti varautuneita ioneja, saadaan selville rasvahappoketjujen rakenteisiin liittyvää tietoa (Murphy ja Axelsen 2011). Lisäksi CID-hajotuksessa käytetty jännite vaikuttaa ionin hajoamiseen: kun jännite on pieni, 20–28 V, poolinen ryhmä irtoaa fosfolipidimolekyylistä neutraalina yhdisteenä, jolloin karakteristisen ryhmän irtoaminen havaitaan yhdisteiden välisenä massa/varaus -suhteen erona, ja kun jännite on suuri, 35–50 V, poolinen ryhmä irtoaa varautuneena ionina, jolloin ryhmän irtoaminen havaitaan omana ioninaan spektrin alapäässä (Brügger ym. 1997).

Kun tarkoituksena on selvittää seoksen fosfolipidiluokkia, käytetään CID-hajotuksessa positiivista ionisaatiota. Näin saadaan selville eri fosfolipidiluokkien tunnusomainen hajoaminen, jonka avulla luokat tunnistetaan. PE:sta lohkeaa etanolamiini-ryhmä, jolloin syntyy $[M-140]^+$ -ioni, jonka avulla PE tunnistetaan. PS:sta lohkeaa seriini-ryhmä, jolloin syntyy $[M-184]^+$ -ioni. PG:sta lohkeaa glyseroli, jolloin syntyy $[M-171]^+$ -ioni. PI:sta lohkeaa inositoli, jolloin syntyy $[M-259]^+$ -ioni. Kaikilla edellä mainituilla fosfolipidiluokilla muodostuu myös $[R_1+116]^+$ -ioni (Murphy ja Axelsen 2011). PE:n, PS:n, PG:n ja PA:n fragmentaation reaktiomekanismi positiivisella ionisaatiolla on kaikilla samanlainen ja se on esitetty kuvassa 4. Toisin kuin muilla fosfolipideillä, PC:n karakteristinen koliinin lohkeaminen on positiivisessa CID-hajotuksessa haastavaa. Positiivisella CID-hajotuksella PC:sta irtoaa rasvahappoja, ja karakteristinen koliini-ryhmä voidaan havaita spektrissä massa/varaus -suhteella m/z 184 (kuva 5; Hsu ja Turk 2009, Murphy ja Axelsen 2011). Eri fosfolipidien karakteristisen tunnistamisen ionit on koottu taulukkoon 1.

Kun CID-hajotuksessa käytetään negatiivista ionisaatiota, syntyneiden ionien variaatio on laaja ja rakenteesta saadaan enemmän tietoa kuin positiivisella ionisaatiolla. Tällöin saadaan kuitenkin tietoa lähinnä rasvahapoista ja niiden rakenteista. Fosfolipidien tunnistaminen on haastavaa negatiivisella ionisaatiolla, sillä fragmenttien massakoot vaihtelevat rasvahappojen mukaan. Taulukossa 2 on esitetty fosfolipidien molekyyli-ioneja yleisimmillä rasvahapoilla sekä positiivisella että negatiivisella ionisaatiolla.



Kuva 4. PE:n, PS:n, PG:n ja PA:n fragmentaation reaktiomekanismi positiivisella ionisaatiolla (Hsu ja Turk 2009).



Kuva 5. PC:n fragmentaation reaktiomekanismi positiivisella ionisaatiolla (Hsu ja Turk 2009).

Taulukko 1. Eri lipidiluokkien karakteristinen tunnistaminen positiivisella ja negatiivisella ionisaatiolla.

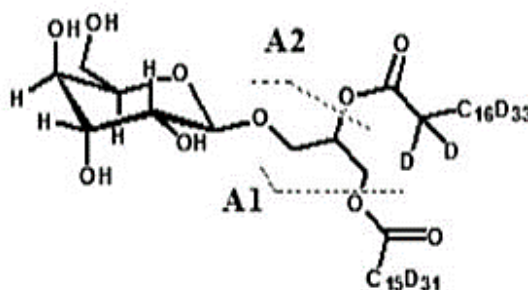
Lipidiluokka	Positiivinen ionisaatio	Negatiivinen ionisaatio	Lähteet
PA	[M-97] ⁺		Hsu ja Turk 2009, Murphy ja Axelsen 2011
PE	[M-140] ⁺	m/z 196	Brügger ym. 1997, Cui ja Thomas 2009, Hsu ja Turk 2009, Murphy ja Axelsen 2011, Anesi ja Guella 2015
PC	[M+H] ⁺ → m/z 184		Brügger ym. 1997, Cui ja Thomas 2009, Hsu ja Turk 2009, Murphy ja Axelsen 2011, Anesi ja Guella 2015
PS	[M-184] ⁺	[M-87] ⁻	Brügger ym. 1997, Hsu ja Turk 2009, Murphy ja Axelsen 2011, Anesi ja Guella 2015
PG	[M-171] ⁺	m/z 227	Welti ym. 2003, Cui ja Thomas 2009, Hsu ja Turk 2009, Murphy ja Axelsen 2011
PI	[M-259] ⁺	m/z 241	Brügger ym. 1997, Cui ja Thomas 2009, Murphy ja Axelsen 2011
MGDG	[M+H-162] ⁺ , [M+H-180] ⁺		Guella ym. 2003, Anesi ja Guella 2015
DGDG	[M+H-162] ⁺ , [M+H-180] ⁺		Guella ym. 2003

Taulukko 2. Fosfolipidien molekyyli-ionit eri rasvahappoja sisältävissä fosfolipideissä. Lähteenä on käytetty Brügger ym. 1997.

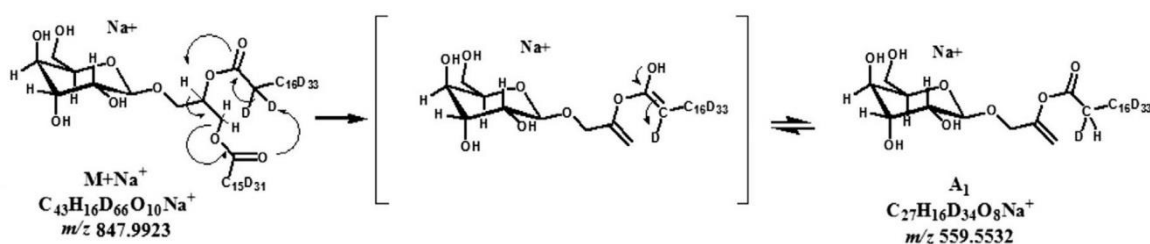
Fosfolipidiluokka	Ioni	Rasvahapot			
		16:0/16:1	16:0/18:1	18:0/18:2	20:4/18:0
PA	[M-H] ⁻	645	671	699	723
PS	[M-H] ⁻	732	758	786	810
PE	[M-H] ⁻	688	716	742	766
PI	[M-H] ⁻	807	833	861	885
PG	[M-H] ⁻	719	747	773	797
PC	[M+H] ⁺	732	758	786	810
PE	[M+H] ⁺	690	718	744	768
PS	[M+H] ⁺	734	760	788	812

Galaktolipidien analysoinnissa suositetaan Na-addukteja (Kim ym. 1999, Guella ym. 2003, Vieler ym. 2007, Gray ym. 2009, Cutignano ym. 2016). Natrium-ionin kiinnittyminen pooliseen ryhmään [M+Na]⁺ lokalisoit positiivisen varauksen voimakkaammin kuin pelkkä vety-ioni [M+H]⁺ (Kim ym. 1999). Näin CID-spektristä saadaan systemaattisempi ja helpompi tulkita kuin protonoidun ionin CID-spektri. MGDG:n ja DGDG:n positiivisessa CID-hajotuksessa havaitaan galaktoosin lohkeaminen [M+H-162]⁺ ja [M+H-180]⁺-ioneina (Guella ym. 2003). Guella ym. (2003) havaitsivat MGDG:lla rasvahappojen lohkeamisen

$[M+Na-R_xCO_2H]^+$ sn 1 asemasta ($x=1$) ja sn 2 asemasta ($x=2$) $[M+H-276]^+$ ja $[M+H-302]^+$ -ioneina, kun kiinnittyneenä oli heksadekatrieenihappo ja eikosapentaenihappo. Vastaavanlainen hajoaminen havaittiin DGDG:lla siten, että rasvahapon irtoamisen jälkeen irtosi myös galaktoosi poolisesta ryhmästä $[M+H-276-162]^+$. Kuvissa 6 ja 7 on esitetty 16:0/18:0-MGDG:n rasvahappojen lohkeamisen reaktiomekanismi. Taulukossa 3 on esitetty MGDG:en molekyyli-ioneja yleisimmillä rasvahapoilla sekä positiivisella että negatiivisella ionisaatiolla ja Na-adduktin avulla ionisoituna. DGDG:en vastaavat molekyyli-ionit on esitetty taulukossa 4.



Kuva 6. 16:0/18:0-MGDG:n rasvahappojen lohkeaminen (Cutiganano ym. 2016). Sn 1 asemassa olevan rasvahapon irtoaminen on kuvattu lyhenteellä A1 ja sn 2 asemassa olevan rasvahapon irtoaminen A2. A1-reaktion tarkempi reaktiomekanismi on esitetty kuvassa 7.



Kuva 7. 16:0/18:0-MGDG:n sn 1 asemassa olevan rasvahapon lohkeamisen reaktiomekanismi (Cutiganano ym. 2016).

Taulukko 3. MGDG:n molekyyli-ionit eri rasvahappoja sisältävissä glykolipideissä eri ionisaatioilla. Lähteenä on käytetty Guella ym. 2003.

Rasvahappokoostumus sn 1/sn 2	[M+Na] ⁺	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
16:0/18:2	777	754	753
16:0/18:1	779	756	755
18:2/18:3	779	756	755
18:2/18:2	801	778	777
18:0/18:2	805	782	781
18:1/18:1	805	782	781
18:3/16:3	769	746	745
20:5/16:3	793	770	769
20:5/18:4	819	796	795

Taulukko 4. DGDG:n molekyyli-ionit eri rasvahappoja sisältävissä glykolipideissä eri ionisaatioilla. Lähteenä on käytetty Guella ym. 2003.

Rasvahappokoostumus sn 1/sn 2	[M+Na] ⁺	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
16:0/18:3	937	914	913
16:1/18:2	937	914	913
16:0/18:2	939	916	915
16:0/18:1	941	918	917
18:3/18:3	959	936	935
18:2/18:3	961	938	937
18:2/18:2	963	940	939
18:0/18:2	967	944	943
18:1/18:1	967	944	943
18:5/18:4	953	930	929
18:4/18:4	955	932	931

2.3.3 Detektointi

Massaspektrometrian detektoinnissa käytetään Faraday-detektoria, elektronimonistinta, mikrokanavalevyjä, valomonistinta tai matriisi-ionikeräimiä. Detektointi voi perustua siihen, että detektori mittaa suoraan siihen osuvat varaukset, kuten Faraday-detektori, mutta suurin osa detektoreista vahvistaa ionisuihkun elektroni- tai valomonistimen tai niiden yhdistelmän avulla (Ketola ym. 2010). Ketolan ym. (2010) mukaan elektronimonistin on eniten käytetty detektori kvadrupoli-, ioniloukku- ja sektorilaitteissa. Toinen yleinen detektori kvadrupolilaitteissa on valomonistin.

2.4 Kvantitointi ELSD-detektorilla

Pooliset lipidit voidaan kvantitoida ELSD-detektorilla, jota käytetään yhdistettynä nestekromatografiin. ELSD soveltuu hyvin sellaisille yhdisteille, joita ei voida määrittää UV-detektorilla. Erityisen hyvin ELSD soveltuu suurten molekyylien määrittämiseen, mutta myös sokerien, lipidien, fosfolipidien ja alkoholien määrittämiseen (Riekkola ja Hyötyläinen 2002). Riekkolan ja Hyötyläisen (2002) mukaan nestekromatografisen erotuksen jälkeen liikkuvaan faasiin sekoitetaan kaasua ja seos sumutetaan pieniksi pisaroiksi. Eluentti haihdutetaan, jolloin mitattavat analyytit muodostavat pieniä partikkeleita. Kaasufaasi kuljettaa analyytit detektointi-alueelle, jossa valonsäteen avulla analyytti saadaan emittoimaan valoa siten, että syntyy ilmiö nimeltä elastinen sironta. Vertaamalla näytemolekyylien elastista sirontaa ns. Rayleighin tekijään, joka kuvaa sironnan määrää puhtaassa liikkuvassa faasissa, saadaan selville näytemolekyylin moolimassa, kun tiedetään konsentraatio, taitekerroin ja valon aallonpituus. Näytteet ja eluentit on tärkeää suodattaa hyvin, sillä epäpuhtaudet häiritsevät valonsironnan luotettavuutta.

Kvantitoinnissa käytetään yleensä sisäistä standardia, jos se vain on mahdollista. Lipidejä tutkittaessa sisäisenä standardina voidaan käyttää synteettisiä yhdisteitä, joiden rasvahappokoostumusta ei tavata luonnossa, tai sellaista yhdistettä ja rasvahappokoostumusta, jota ei ole näytteessä (Brügger ym. 1997).

III KOKEELLINEN TUTKIMUS

1 Tutkielman kokeellisen osan tavoitteet

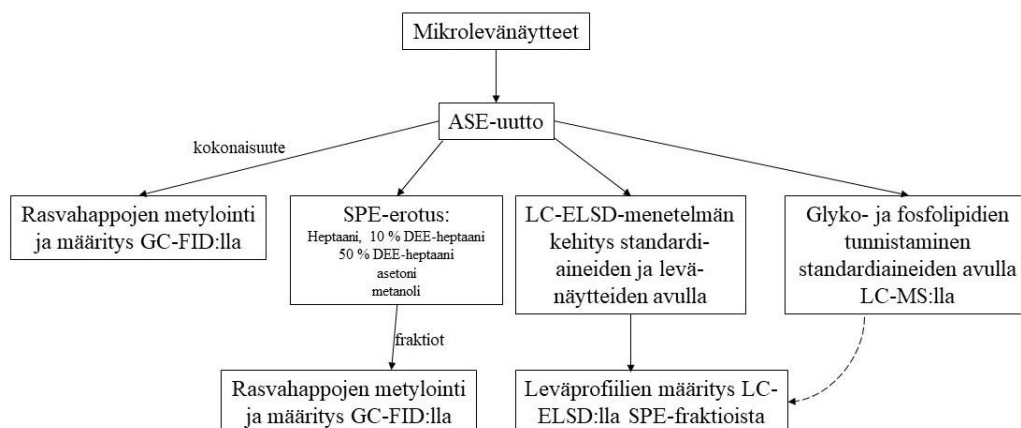
Tutkielman kokeellisen osan tavoitteena oli luokitella mikrolevien sisältämät lipidit poolisuuden mukaan selvittäen osuudet rasvahappokoostumuksen perusteella. Lisäksi tavoitteena oli kehittää HPLC-menetelmä mikrolevien fosfo- ja glykolipidien määrittämiseen. Poolisten lipidien rasvahappojen määrittämisessä mikrolevänäytteet uutettiin ASE-uutolla, erotettiin uutteen lipidit poolisuuden mukaan kiinteäfaasiuutolla (solid phase extraction, SPE) ja määritettiin rasvahappopitoisuudet kaasukromatografisesti. HPLC-menetelmä kehitettiin tutkimalla poolisten lipidien profiileja LC-ELSD:lla käyttäen fosfolipidien malliaineena kaupallista fosfolipidiseosta ja glykolipidien malliaineena kaurauutetta. Kehitetyllä LC-ELSD-menetelmällä tutkittiin *E. gracilis* ja *Selenastrum* sp. -mikrolevänäytteiden poolisia lipidiluokkia. Mikrolevänäytteissä esiintyvät fosfo- ja glykolipidit tunnistettiin LC-MS:lla.

Tutkimus oli osa laajempaa mikrolevätutkimusta LEVARBIO-hankkeessa. Levien arvokkaiden biomolekyylien ja biomassan hyödyntäminen ravinnossa, rehuna ja energiana (LEVARBIO) -hankkeen tavoitteena oli edistää levien tuottamien arvojakeiden ja leväbiomassan hyödyntämistä eri sovelluskohteissa: elintarvike-, rehu-, energia- ja lannoitekäytössä. Hankkeen tavoitteena oli lisäksi hyödyntää leväkasvatuksessa sivuvirtojen ravinteita ja edistää näin ravinnekierrätystä.

2 Tutkimuksen kulku

Kokeellinen tutkimus suoritettiin Helsingin yliopiston elintarvike- ja ravitsemustieteiden osaston laboratorioissa kevään 2016 sekä kevään ja syksyn 2017 aikana. Keväällä 2016 tehtiin mikrolevänäytteiden rasvahappomäärittäyksiä kokonaisuutelle ja SPE-fraktioinnin uutteille. HPLC-menetelmän kehitys aloitettiin keväällä 2017 tekemällä esikokeita standardiaineilla nestekromatografilla ja jatkettiin kehittämällä aiempien ajo-ohjelmien pohjalta nestekromatografinen menetelmä poolisten lipidien määrittämiseen. Syksyn 2017 aikana poolisten lipidien määrittämismenetelmää testattiin tunnistamalla yhdisteet massaspektrometrisesti sekä standardi- että levänäytteistä. Lisäksi määritettiin

levänäytteiden poolisten lipidien profiilit nestekromatografisesti. Kokeellisen osuuden vaiheet on kuvattu kuvassa 8.



Kuva 8. Kokeellisen tutkimuksen vaiheet. Kuvassa DEE=dietyylieetteri.

3 Näytteet ja standardit

Tutkittavana materiaalina oli eri lähteistä saatua ja eri kasvatusolosuhteissa kasvatettua *E. gracilis* ja *Selenastrum* sp. -mikrolevää. SPE-menetelmän testauksessa käytettiin *Nannochloropsis gaditana* -mikrolevää. Kyseistä mikrolevää käytettiin myöhemmin laboratorion sisäisenä vertailunäytteenä. Varsinaisina näytteinä SPE-testauksessa oli *Selenastrum* sp. bioreaktoreissa 1, 2 ja 3 kasvaneet erät (loppufuugaus 1.2.2016, homogenisointi 1.3.2016) sekä *E. gracilis* bioreaktorissa 1 (9.10.2015), bioreaktorissa 2 (12.10.2015) ja bioreaktorissa 3 (12.10.2015) kasvaneet erät. LC-ELSD esikokeissa ja menetelmän kehityksessä keväällä 2017 käytettiin Helsingin yliopiston Lahden yliopistokeskuksen bio- ja ympäristötieteellisessä tiedekunnassa kasvatettua *E. gracilis* -mikrolevän koe-erää nro 8 (7.12.2016). Kaikki näytteet pakkaskuivattiin keräyksen jälkeen ja säilytettiin pakkasessa -20°C :ssa.

Yhtenä tutkittavana mikrolevämateriaalina oli ylikriittisellä hiilidioksiduuutolla (supercritical carbon dioxide extraction, SFE) uutettua *E. gracilis* -levämateriaalia. Kyseiset näytteet oli kasvatettu Lahdessa bio- ja ympäristötieteellisessä tiedekunnassa ja uutettu SFE:lla Aromtech Oy:ssä (Tornio). Aromtech toimitti kolme eri *E. gracilis* -näytettä:

- uutettu levämateriaali
- uuttojäännös yhden SFE-uuton jälkeen, pakkauspäivä 14.11.2016, ja
- uuttojäännös kahden SFE-uuton jälkeen, pakkauspäivä 18.11.2016.

Kehitetyllä LC-ELSD-menetelmällä määritettiin pooliset lipidiluokat Aromtechin toimittamille kolmelle eri *E. gracilis* -erälle, Lahdessa kasvatetuille kolmelle eri *E. gracilis* -erälle sekä Hämeen ammattikorkeakoulussa kasvatetuille kahdelle eri *E. gracilis* -erälle. Lahdessa kasvatetut mikroleväerät olivat koe-erä nro 8:n bioreaktorit 1, 2 ja 3 (17.6.2016). Hämeen ammattikorkeakoulussa kasvatetut erät olivat meijerin retentaatissa kasvatetut viljelmät 1 ja 4 (3.4.2017), joista viljelämä 1 oli kasvatettu valossa ja viljelämä 4 pimeässä.

MS-tunnistuksessa käytettiin Aromtechin toimittamaa uutettua *E. gracilis* -mikrolevämaterialiaa sekä Hämeen ammattikorkeakoulussa meijerin retentaatissa kasvatetun *E. gracilis* -mikrolevän koe-erää numero 3 (26.9.2016).

Rasvahappojen kaasukromatografisessa määityksessä vertailunäytteenä käytettiin rypsiöljyä ja sisäisenä standardina 19:0-rasvahappometyyliesteriä. LC-ELSD-menetelmän kehityksessä ja mikroleväuutteiden määrittämisessä fosfolipidien tunnistamiseen käytettiin lesitiiniä (Soyalecithin 1360 mg, Solgar, parasta ennen 05/17, eränumero 419939-01, saapunut ja avattu 12.5.2015 AML), josta valmistettiin kantaliuos (10 mg/ml, 10 %-isopropanoli-dikloorimetaani-0,01 %-BHT) ja edelleen käyttöliuos (1 mg/ml, heptaani-40 %-isopropanoli-0,01 %-BHT). Lesitiinistandardia käytettiin menetelmän kehityksessä sekä suoraan koko näytteenä että SPE-erotuksen jälkeen fraktioina. Lesitiinin lisäksi standardiaineena käytettiin poolisten lipidien seosta Pol Mix 71 (Larodan AB, Solna, Ruotsi, kantaliuos 1 mg/ml heptaani-isopropanoli 3:2 0,01 % BHT, valmistettu 14.4.2016 JoK). Glykolipidien tunnistamiseen käytettiin kaurasta asetonilla ASE-uutolla saatua uutetta. Kauranäyte oli lajiltaan Steinar, kasvatusvuosi 2013 ja pakkaus oli avattu 8.10.2015.

MS-määityksessä fosfolipidien tunnistamiseen käytettiin Solgar-soijalesitiiniä, joka on kuvattu yllä sekä Phosphomix-standardia (Sigma Phospholipid Mixture for HPLC, from soybean, P-3817, Lot 98H8000). Phosphomix-standardista valmistettiin liuos, joka sisälsi 0,6 mg/ml L- α -fosfatidyylikoliinia, 0,48 mg/ml L- α -fosfatidyylietanolamiinia, 0,36 mg/ml L- α -fosfatidyyli-inositolia ja 0,12 mg/ml L- α -lysofosfatidyylikoliinia. Liuoksen kokonaisfosfolipidipitoisuus oli 1,56 mg/ml. Sekä fosfo- että glykolipidien tunnistamiseen käytettiin PE-standardia (Sigma L- α -phosphatidylethanolamine (L- α -cephalin), type II-S, Commercial Grade, from sheep brain, P-4264, 1 g, Lot 66H8395, EEC No 292-752-3,

saapunut 5/2015 (AML), säilytetty pakkasessa -20 °C, avattu 16.8.2017). Vastoin fosfatidyylietanolamiiniin viittaavaa nimeään, PE-standardi sisälsi sekä fosfo- että glykolipidejä, sillä standardi on käsittelemätön uute lampaan aivoista. Tämän vuoksi kyseisen standardin eri lipidiluokkien pitoisuudet tai rasvahappokoostumukset eivät ole tiedossa. Glykolipidien tunnistamiseen käytettiin kauranäytettä (Non-heated Oats, Fazer Mill 6.3.2015, jauhettu 2.6.2017, säilytetty -20 °C:ssa), joka uutettiin asetonilla ASE-uutolla.

4 Menetelmät

4.1 Paineistettu nesteuutto (ASE)

ASE-uutossa näytemateriaali uutetaan halutulla liuottimella korkeaa painetta kestävässä terässylinterissä. ASE-uuton soveltuvuutta mikrolevien uuttamiseen on tutkinut Herrero ym. (2005) sekä Anttila (2017). ASE-uuttoon käytettiin Dionex ASE 200 Accelerated Solvent Extractor -laitetta ja AutoASE-ohjelmistoa. Uutossa käytetty hiekka oli Ottawa Sand for ASE (25.2.2016). Mikrolevien lipidien uuttamiseen käytettiin Anttilan (2017) uuttotehokkuudeltaan parhaimmiksi osoittautuneita parametrejä. Uuttoliuottimena käytettiin etanolia, lämpötilana 125 °C, uuttoaikana 11 min, uuttokertoina 1 kertaa ja paineena 1500 psi (uutto-ohjelma ALGO_01). Kauran uuttamisessa uuttoliuottimena käytettiin asetonia, lämpötilana 100 °C, uuttokertoina 2 kertaa ja paineena 1000 psi (uutto-ohjelmana ETK225). ASE-uutolla saaduista uutteista haihdutettiin liuotin Heidolph-rotavapor-pyöröhaihduttajalla 30 °C:ssa ja jäännös siirrettiin heptaani:isopropanoli 3:2 -liuoksella 10 ml:n mittapulloon. Saatuja uutteita tutkittiin joko suoraan tai SPE-erotuksen jälkeen.

4.2 Kiinteäfaasiuutto (SPE)

SPE-erotuksen avulla näytteet erotettiin poolisuuden mukaan neljään eri fraktioon. SPE-erotuksessa käytettiin silikaa sisältävää pylvästä. Silika sitoo pylväisiin pipetoidut pooliset yhdisteet ja yhdisteet eluoituvat liuotinta vaihtamalla. SPE-erotuksessa käytettiin Phenomenex Strata Si-1 Silica -pylväitä (55 µm, 70 Å, 500 mg/3 ml). Pylväät aktivoitiin 2 * 2,5 ml:lla heptaania. Ennen pylväisiin pipetointia ASE-uutteita otettiin 3 ml, haihdutettiin typpivirrassa 37 °C:ssa ja liuotettiin 200 µl:an dikloorimetaania ja 800 µl:an heptaania. Uutteet siirrettiin aktivoituihin pylväisiin. Näyteputki huuhdeltiin 2,5 ml:lla heptaania, joka

siirrettiin myös pylvääseen. Tämän jälkeen aloitettiin fraktioiden kerääminen. Kutakin liuotinta pipetoitiin pylvääseen 2 * 2,5 ml. Ensimmäiseen fraktioon kerättiin heptaanilla ja 10 %-dietyylieetteri-heptaanilla eluoitunut näyttemateriaali. Toiseen fraktioon kerättiin 50 %-dietyylieetteri-heptaanilla, kolmanteen asetonilla ja neljänteen metanolilla eluoitunut näyttemateriaali (taulukko 5). Saaduista fraktioista haihdutettiin liuotin typpivirrassa 35 °C:ssa. Jäännös liuotettiin 1 ml:an heptaani-isopropanoli 3:2 -liuokseen, johon oli lisätty hapettumisen estämiseksi 0,01 % BHT:a. Rasvahappomääritystä varten fraktioille tehtiin metylointi (kohta 4.3). Poolisten lipidien profiileja varten näytteet suodatettiin Acrodisc GHP (0,45 µm, 13 mm)-suodattimilla vialeihin ja määritettiin LC-ELSD:lla.

Taulukko 5. SPE-erotuksessa käytetyt liuottimet.

Fraktio	Liuotin
Fraktio 1	heptaani, 10 %-dietyylieetteri-heptaani
Fraktio 2	50 %-dietyylieetteri-heptaani
Fraktio 3	asetoni
Fraktio 4	metanoli

4.3 Rasvahappojen metylointi ja määrittäminen kaasukromatografisesti (GC-FID)

Mikrolevien kokonaisuutteista määritettiin kokonaisrasvahappopitoisuus ja -koostumus. ASE-uutteiden SPE-erotuksella saaduista fraktioista määritettiin fraktiokohtainen rasvahappokoostumus. Määrittämisessä käytetty laitteisto koostui Agilent 7683 -automaattisesta näytteenäytöstä, Agilent 6890N -kaasukromatografista, Supelco Omegawax 250 -kolonnista (30 m * 0,25 mm, 0,25 µm) ja FID-detektorista. Kantokaasuna käytettiin heliumia virtausnopeudella 1,1 ml/min ja detektorikaasuina vetyä ja ilmaa. Näytteenäytöksen lämpötila oli 240 °C ja jakosuhte 1/15. Detektorin lämpötila oli 250 °C.

Mikroleväuutteen ja sisäisen standardin seoksesta (3 ml ja 1 ml) haihdutettiin liuotin typpivirrassa +40 °C:ssa. Haihdutuksen jälkeen lisättiin 0,5 ml tolueenia ja 2 ml 1 %-riikkihappo-metanolia, ravisteltiin ja pidettiin näytteitä 85 °C:ssa yhden tunnin ajan, jona aikana rasvahapot metyloituivat. Jäähdytettävään koeputkeen lisättiin 2 ml heptaanilla ja 2 ml natriumkloridilla kyllästettyä vettä. Koeputkia ravisteltiin 1 minuutin ajan, jonka jälkeen ylempi faasi otettiin kuivausainetta sisältävään koeputkeen ja annettiin olla ½ tuntia. Näytteet siirrettiin vialeihin ja käsittelyn seurauksena syntyneet rasvahappojen metyylesterit määritettiin GC-FID:lla. Kvantitoinnissa käytettiin sisäisen standardin

menetelmää. Sisäisenä standardina oli 19:0-rasvahappometyyliesteri. Rasvahappojen metyyliestereiden antamien samansuuruisten vasteiden avulla pitoisuus määritettiin suhteessa sisäisen standardin määrään. GD-FID-määritysten perusteella saatiin selville kokonaisuutteen ja fraktioiden lipidipitoisuudet rasvahappojen metyyliestereinä. Kokonaisuuttele tehtiin 9 rinnakkaismäärittystä, *Selenastrum* sp. -mikrolevän fraktioille 4 rinnakkaismäärittystä ja *Euglena gracilis* -mikrolevän fraktioille 6 rinnakkaismäärittystä.

4.4 Nestekromatografinen määrittäminen (LC-ELSD)

Mikroleväuutteen nestekromatografisessa määrittämisessä käytettiin Waters 2690 Separation Module -kromatografia, LiChrosorb Diol -kolonna (100 x 3 mm 5 µm), Waters 2420 ELS Detector -valonsirontadetektoria, Waters 996 Photodiode Array Detector -diodirividetektoria ja Empower2 -ohjelmistoa. Määrittämisessä käytettiin gradienttiajoa. Olemassa olleesta kolme liuotinta sisältäneestä gradienttiohjelmasta optimoitiin kaksi liuotinta sisältävä gradienttiohjelma. Alkuperäinen, kolme liuotinta sisältänyt ajo-ohjelma on esitetty taulukossa 6 (polar_16). Kehitetyssä ajo-ohjelmassa ajoliuoksina käytettiin A: heptaani-2 % isopropanoli-0,1 % etikkahappo -liuosta ja B: isopropanoli-2 % vesi-0,1 % etikkahappo -liuosta. Kehitetty ajo-ohjelma on esitetty taulukossa 7 (polar_jk2A). Gradienttipiikin välttämiseksi polar_jk2A-ajo-ohjelmassa pidettiin jatkuvasti pieni virtaus B-liuotinta. Ajo-ohjelman loppuun säädettiin kahdenkymmenen minuutin ajo alkutilanteen prosenttiosuuksilla, jotta kolonni tasapainottui ennen uuden näytteen injektointia. Kahden liuottimen ajo-ohjelman optimoinnissa käytettiin kohdassa 3 esiteltyjä standardiaineita ja levänäytteitä. Levänäytteiden poolisia lipidejä määritettäessä näytteille tehtiin 3 rinnakkaismäärittystä.

Taulukko 6. Olemassa olleen, kolme liuotinta sisältäneen gradientin ohjelma Polar_16. Ajoliuokset A: heptaani-0,1 % etikkahappo, B: isopropanoli-0,1 % etikkahappo ja C: vesi.

aika	virtaus ml/min	A %	B %	C %
0,00	0,5	99,0	1,0	0,0
8,00	0,5	99,0	1,0	0,0
30,00	0,5	58,0	40,0	2,0
40,00	0,5	45,0	50,0	5,0
50,00	0,5	45,0	50,0	5,0
51,00	0,5	50,0	50,0	0,0
52,00	0,5	99,0	1,0	0,0
60,00	0,5	99,0	1,0	0,0

Taulukko 7. Kehitetty, kaksi liuotinta sisältävä gradienttiohjelma Polar_jk2A. Ajoliuokset A: heptaani-2 % isopropanoli-0,1 % etikkahappo ja B: isopropanoli-2 % vesi-0,1 % etikkahappo.

aika	virtaus ml/min	A %	B %
0,00	0,5	99,0	1,0
8,00	0,5	99,0	1,0
20,00	0,5	50,0	50,0
30,00	0,5	50,0	50,0
40,00	0,5	99,0	1,0
60,00	0,5	99,0	1,0

4.5 Massaspektrometrinen tunnistus (LC-MS)

Pooliset lipidit tunnistettiin massaspektrometrisesti. Laitteistossa käytettiin Thermo Fisher Scientific Accela Autosampler -näytteensyöttäjää, Thermo Fisher Scientific Accela Pump -pumppua, LiChrosorb Diol -kolonnia (100 x 3 mm 5 µm), Thermo Fisher Scientific Accela PDA Detector -diodirividetektoria, Thermo Fisher Scientific Finnigan LXQ -massaspektrometria ja Xcalibur-tulosten-käsittelyohjelmaa. Finnigan LXQ -massaspektrometri toimii lineaari-ioniloukulla. Poolisten lipidien tunnistamisessa käytettiin ESI- ja APCI-ionisaatiota. Haihdutuslämpötila oli 400 °C, purkautumisvirta 10 µA, kapillaarilämpötila 350 °C ja kapillaarijännite 5 V. Msms-ioni-kromatografian CID-hajotuksessa käytettiin 30,0 V jännitettä.

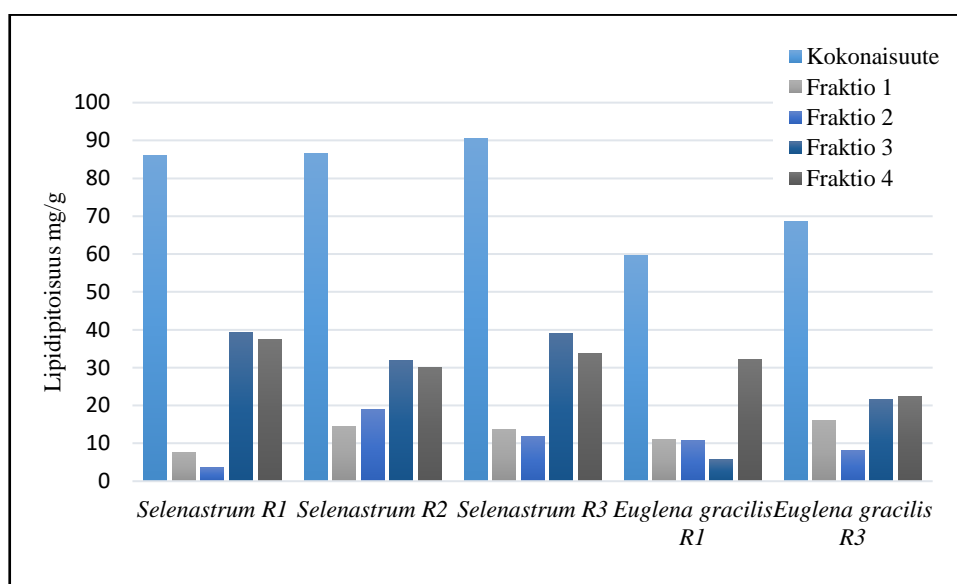
Lipidien MS-tunnistuksessa käytettiin kohdassa 3 esiteltyjä standardiaineita ja mikrolevänäytteitä. Näytteet suodatettiin ennen injektointia suodattimella (VWR International 13 mm Syringe Filter 0,2 µm PTFE Membrane, European Article No. 514-0068, Batch No. 21866649).

MS-tulosten tulkinnessa ja yhdisteiden tunnistamisessa on hyödynnetty Byrdwellin lipidianalytiikkaan keskittyvää internet-sivua (Byrdwell 2019). Lisäksi positiivisen ionisaation tulosten tulkinnessa on hyödynnetty Hsun ja Turkin (2009) julkaisemia tietoja. Negatiivisen ionisaation tulosten tulkinnessa on hyödynnetty Byrdwellin (2019) lisäksi Brüggerin ym. (1997) ja Guellan ym. (2003) julkaisemia tietoja. Yhdistämällä näiden lähteiden tietoja tunnistettiin näytteissä havaitut yhdisteet.

5 Tulokset

5.1 Mikrolevänäytteiden ja SPE:lla erotettujen fraktioiden lipidipitoisuudet ja rasvahappokoostumukset

Selenastrum sp. ja *E. gracilis* -mikrolevänäytteiden lipidipitoisuutta ja rasvahappokoostumusta tutkittiin kokonaisuutteista ja SPE:lla erotetuista fraktioista. Esikokeissa oli selvitetty TLC:n avulla, että mielenkiinnon kohteena olevat pooliset lipidit eluoituivat 3. ja 4. fraktiossa.



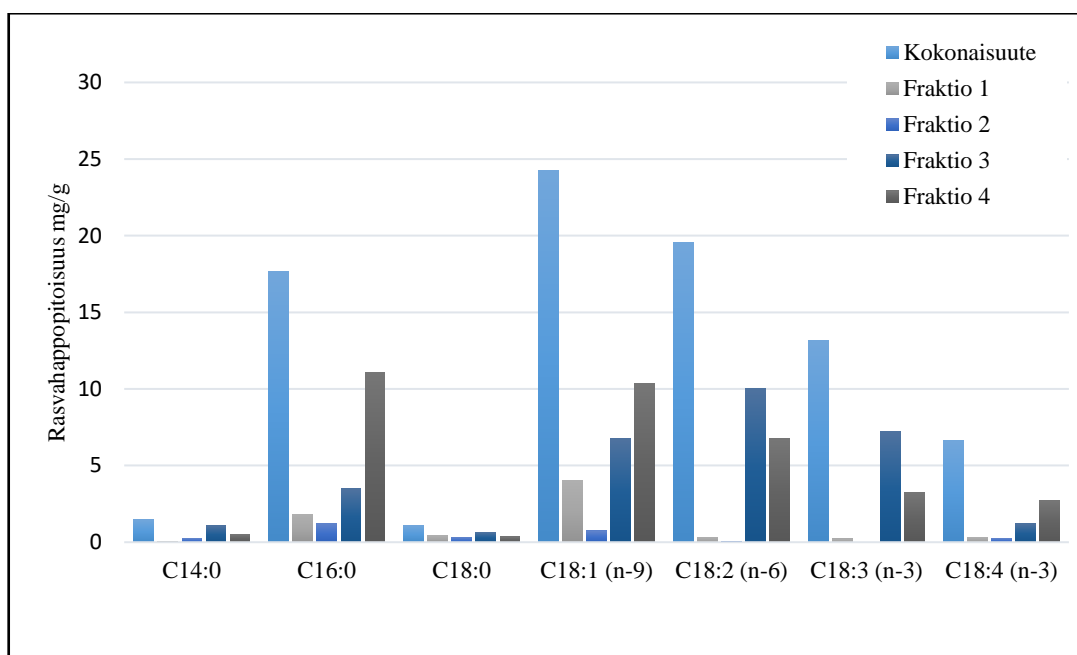
Kuva 9. *Selenastrum* sp. ja *E. gracilis* -mikrolevien eri kasvatuserien lipidipitoisuus (mg/g) kokonaisuutteessa (n=9) sekä fraktioissa 1–4 rasvahappojen metyyliestereiden summina ilmoitettuna. *Selenastrum* sp. fraktioiden 1–4 n=4 ja *E. gracilis* fraktioiden 1–4 n=6.

Selenastrum sp. -mikrolevän lipidipitoisuus oli suurempi kuin *E. gracilis* -mikrolevän (kuva 9). *Selenastrum* sp. -mikrolevän kasvatuserissä R1–R3 rasvapitoisuus vaihteli välillä 86–91 mg/g (liite 1, taulukko 1). *Selenastrum* sp. -mikrolevänäytteissä eniten rasvahappoja oli fraktiossa 3 ja toiseksi eniten fraktiossa 4. Fraktioissa 1 ja 2 rasvahappoja oli vähiten. Fraktioiden rasvahappopitoisuuksissa oli kuitenkin vaihtelua eri kasvatuserien välillä. *E. gracilis* -mikrolevän lipidipitoisuus kasvatuserissä R1 ja R3 oli 60 ja 68 mg/g (liite 2, taulukko 1). *E. gracilis* -mikrolevänäytteissä eniten rasvahappoja oli fraktiossa 4. *E. gracilis* -mikrolevänäytteissä rasvahappopitoisuudet vaihtelivat siten, että kasvatuserässä R1 fraktion 3 rasvahappopitoisuus oli pienin, kun taas kasvatuserässä R3 toiseksi suurin. Myös fraktioiden 1 ja 2 rasvahappopitoisuudet vaihtelivat kasvatuserien välillä. Vaikka mikrolevälajien ja kasvatuserien välillä olikin eroa rasvahappopitoisuuksissa, nähdään

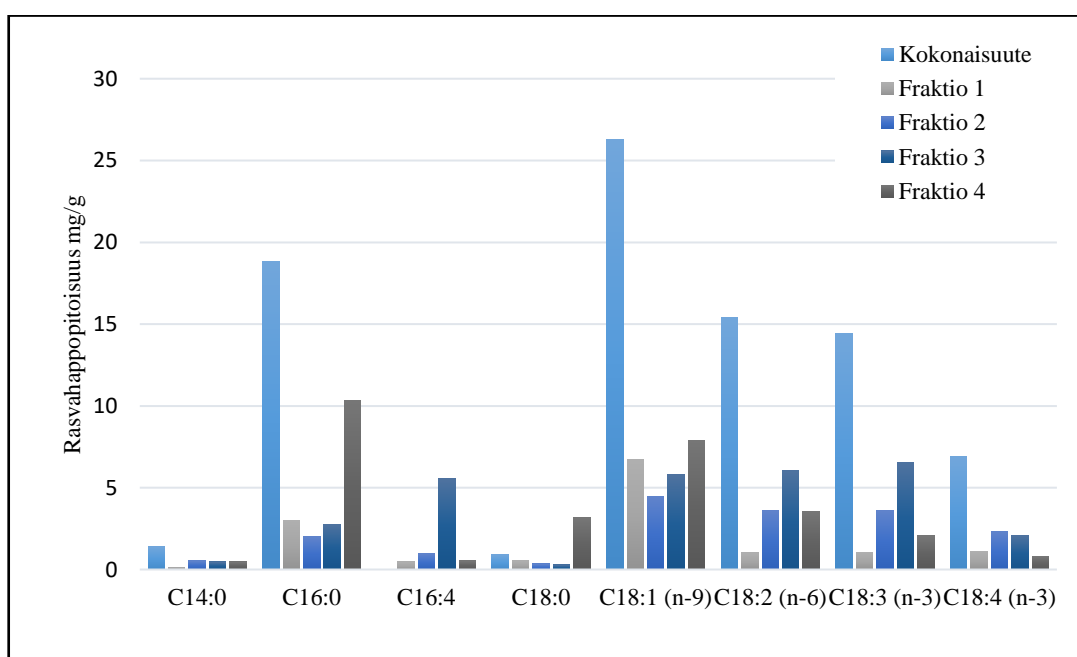
kuvasta 9, että molemmilla lajeilla ja kaikissa kasvatuserissä suurin osa rasvahapoista oli fraktioissa 3 ja 4 eli poolisissa fraktioissa. Lisäksi havaitaan, että fraktioiden yhteenlaskettu rasvahappopitoisuus vastasi hyvin kokonaisuutteen määritettyä rasvahappopitoisuutta kaikissa näytteissä (liitteet 1 ja 2). Esimerkiksi *Selenastrum* sp. -mikrolevän kasvatuserän R1 kokonaisuutteen rasvahappopitoisuus oli 86 mg/g ja fraktioiden yhteenlaskettu rasvahappopitoisuus 87,6 mg/g, ja *E. gracilis* -mikrolevän kasvatuserän R1 kokonaisuutteen rasvahappopitoisuus oli 59,5 mg/g ja fraktioiden yhteenlaskettu rasvahappopitoisuus 59,3 mg/g. Tällä tavoin voidaan arvioida SPE-menetelmän luotettavuutta vertaamalla kokonaisuutteen rasvahappopitoisuutta ja fraktioiden yhteenlaskettua rasvahappopitoisuutta.

Selenastrum sp. -mikrolevän kasvatuserä R1 sisälsi eniten öljyhappoa (24 mg/g), linolihappoa (20 mg/g) ja palmitiinihappoa (18 mg/g) (liite 1, taulukko 1). Fraktio 1 sisälsi eniten öljyhappoa ja fraktio 2 palmitiinihappoa (kuva 10). Poolisissa lipideissä fraktioissa 3 ja 4 yleisimmät rasvahapot olivat palmitiinihappo, öljyhappo, linolihappo ja α -linoleenihappo (kuva 10).

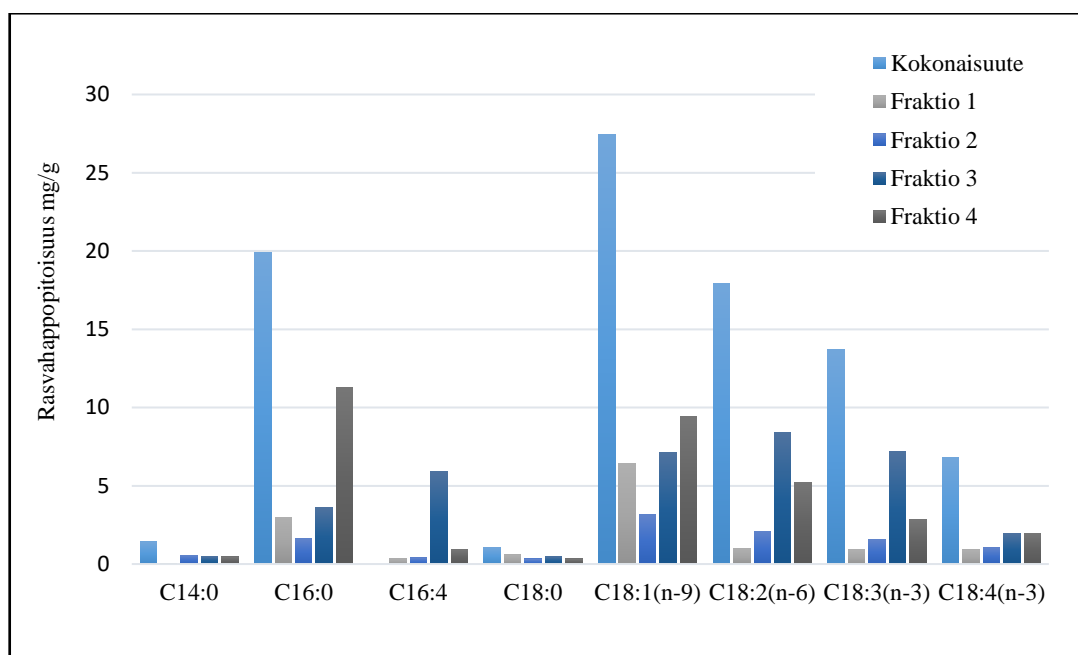
Selenastrum sp. -mikrolevän kasvatuserä R2 sisälsi eniten öljyhappoa (26 mg/g), palmitiinihappoa (19 mg/g) ja linolihappoa (15 mg/g) (liite 1, taulukko 1). Fraktiot 1 ja 2 sisälsivät eniten öljyhappoa (kuva 11). Poolisissa lipideissä fraktioissa 3 ja 4 yleisimmät rasvahapot olivat palmitiinihappo, heksadekatetraeenihappo, öljyhappo, linolihappo ja α -linoleenihappo (kuva 11).



Kuva 10. *Selenastrum* sp. -mikrolevän kasvatuserän R1 rasvahappopitoisuudet (mg/g) kokonaisuuhteessa (n=9) sekä fraktioissa 1–4 (n=4). Rasvahappopitoisuudet on ilmoitettu rasvahappojen metyyliestereinä.



Kuva 11. *Selenastrum* sp. -mikrolevän kasvatuserän R2 rasvahappopitoisuudet (mg/g) kokonaisuuhteessa (n=9) sekä fraktioissa 1–4 (n=4). Rasvahappopitoisuudet on ilmoitettu rasvahappojen metyyliestereinä.



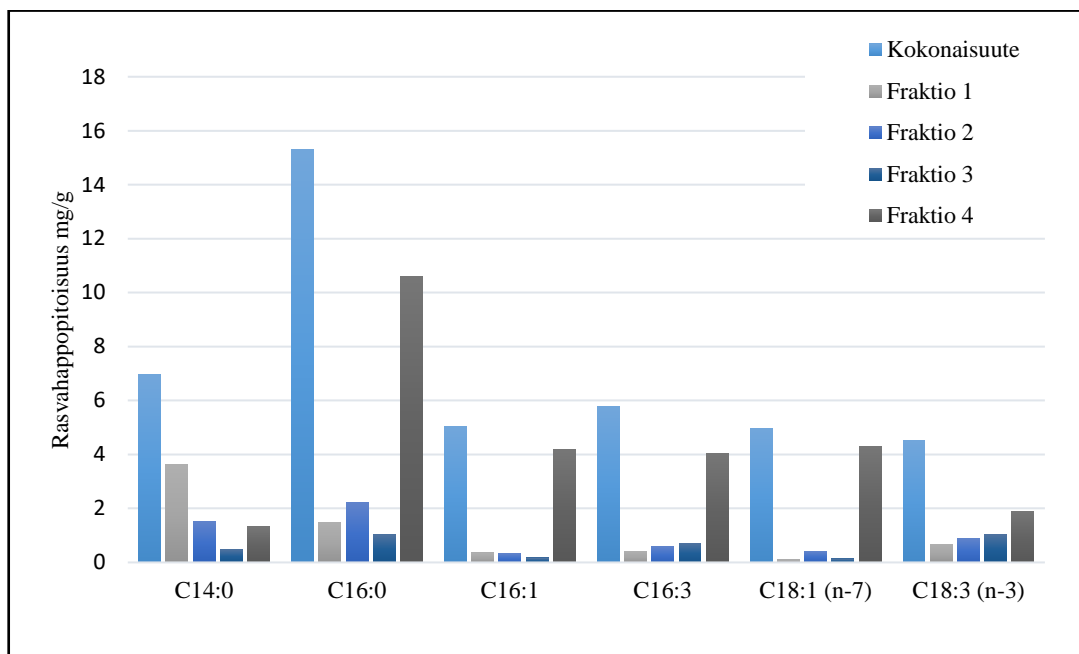
Kuva 12. *Selenastrum* sp. -mikrolevän kasvatuserän R3 rasvahappopitoisuudet (mg/g) kokonaisuudessa (n=9) sekä fraktioissa 1–4 (n=4). Rasvahappopitoisuudet on ilmoitettu rasvahappojen metyyliestereinä.

Selenastrum sp. -mikrolevän kasvatuserä R3 sisälsi eniten öljyhappoa (27 mg/g), palmitiinihappoa (20 mg/g) ja linolihappoa (18 mg/g) (liite 1, taulukko 1). Fraktio 1 ja 2 sisälsivät eniten öljyhappoa (kuva 12). Poolisissa lipideissä fraktioissa 3 ja 4 yleisimmät rasvahapot olivat palmitiinihappo, heksadekatetraeenihappo, öljyhappo, linolihappo ja α -linoleenihappo (kuva 12).

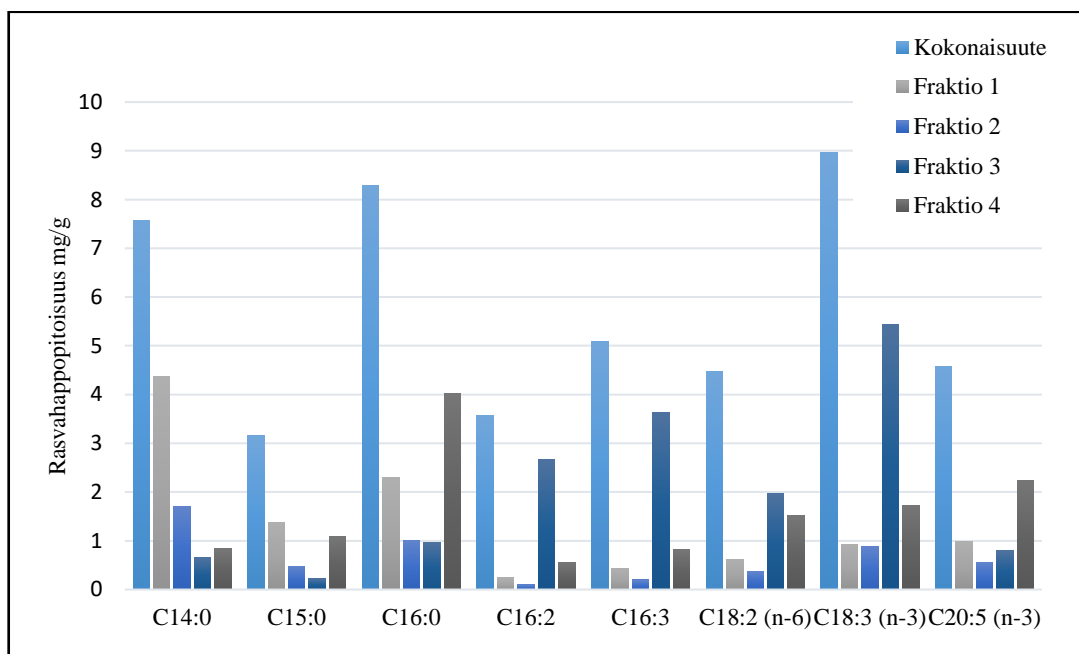
Selenastrum sp. -mikrolevän kasvatuserien R1, R2 ja R3 rasvahappokoostumuksissa oli eroa. Kasvatuserien R2 ja R3 fraktiossa 3 havaittiin heksadekatetraeenihappoa, jota ei muissa fraktioissa tai kasvatuserässä R1 juurikaan havaittu. Kasvatuserän R2 fraktion 4 steariinihappopitoisuus oli suurempi kuin kasvatuserissä R1 ja R3. Kasvatuserässä R2 öljyhappoa oli kaikissa fraktioissa, kun kasvatuserissä R1 ja R3 linolihappoa oli lähinnä fraktioissa 3 ja 4. Sama havainto tehtiin linolihapon, α -linoleenihapon sekä stearidonihapon kohdalla. Fraktioiden myristiinihappo- ja palmitiinihappopitoisuuksissa ei havaittu eroa kasvatuserien välillä.

E. gracilis -mikrolevän kasvatuserä R1 sisälsi eniten palmitiinihappoa (15 mg/g), myristiinihappoa (7 mg/g) ja heksadekatrieenihappoa (6 mg/g) (liite 2, taulukko 1). Fraktio 1 sisälsi eniten myristiinihappoa ja fraktio 2 palmitiinihappoa (kuva 13). Poolisissa lipideissä

fraktioissa 3 ja 4 yleisimmät rasvahapot olivat palmitiinihappo, palmitoleiinihappo, heksadekatrieenihappo ja öljyhappo (kuva 13).



Kuva 13. *E. gracilis* -mikrolevän kasvatuserän R1 rasvahappopitoisuudet (mg/g) kokonaisuutteen (n=9) sekä fraktioissa 1–4 (n=6). Rasvahappopitoisuudet on ilmoitettu rasvahappojen metyyliestereinä.



Kuva 14. *E. gracilis* -mikrolevän kasvatuserän R3 rasvahappopitoisuudet (mg/g) kokonaisuutteen (n=9) sekä fraktioissa 1–4 (n=6). Rasvahappopitoisuudet on ilmoitettu rasvahappojen metyyliestereinä.

E. gracilis -mikrolevän kasvatuserä R3 sisälsi eniten α -linoleenihappoa (9 mg/g), palmitiinihappoa (8 mg/g) ja myristiinihappoa (8 mg/g) (liite 2, taulukko 1). Fraktio 1 ja 2 sisälsivät eniten myristiinihappoa (kuva 14). Poolisissa lipideissä fraktioissa 3 ja 4 yleisimmät rasvahapot olivat palmitiinihappo, heksadekadieenihappo, heksadekatrieenihappo, linolihappo, α -linoleenihappo ja eikosapentaeenihappo (kuva 14).

E. gracilis -mikrolevän kasvatuserien R1 ja R3 rasvahappokoostumuksissa oli eroa. Kasvatuserässä R1 havaittiin palmitoleiinihappoa, jota ei havaittu kasvatuserässä R3 juurikaan. Kasvatuserässä R3 sen sijaan havaittiin pentadekaanihappoa, heksadekadieenihappoa sekä linolihappoa, joita ei havaittu kasvatuserässä R1 juurikaan. Fraktion 4 palmitiinihappopitoisuus oli suurempi kasvatuserässä R1 kuin R3, kun taas fraktion 1 palmitiinihappopitoisuus oli suurempi kasvatuserässä R3. Fraktion 3 heksadekatrieenihappopitoisuus oli suurempi kasvatuserässä R3 kuin R1. Kasvatuserän R3 α -linoleenihappopitoisuus oli suurempi kuin kasvatuserän R1, ja kasvatuserässä R3 selkeästi eniten α -linoleenihappoa oli fraktiossa 3. Kasvatuserässä R3 havaittiin eikosapentaeenihappoa, jota ei havaittu kasvatuserässä R1 juurikaan. Eikosapentaeenihappoa oli eniten fraktiossa 4. Fraktioiden myristiinihappopitoisuuksissa ei havaittu juurikaan eroa kasvatuserien välillä. Tulosten perusteella kasvatuserä R3 vaikutti sisältävän enemmän pitkäketjuisia ja monityydyttymättömiä rasvahappoja kuin kasvatuserä R1.

Sekä *Selenastrum* sp. että *E. gracilis* -näytteissä havaittiin, että fraktiot 1 ja 2 sisälsivät lyhytketjuisia, tyydyttyneitä rasvahappoja, kuten myristiinihappoa, pentadekaanihappoa ja palmitiinihappoa, kun taas fraktiot 3 ja 4 eli pooliset lipidit sisälsivät pitkäketjuisia, tyydyttymättömiä rasvahappoja, kuten linolihappoa, α -linoleenihappoa ja eikosapentaeenihappoa (*E. gracilis* R3).

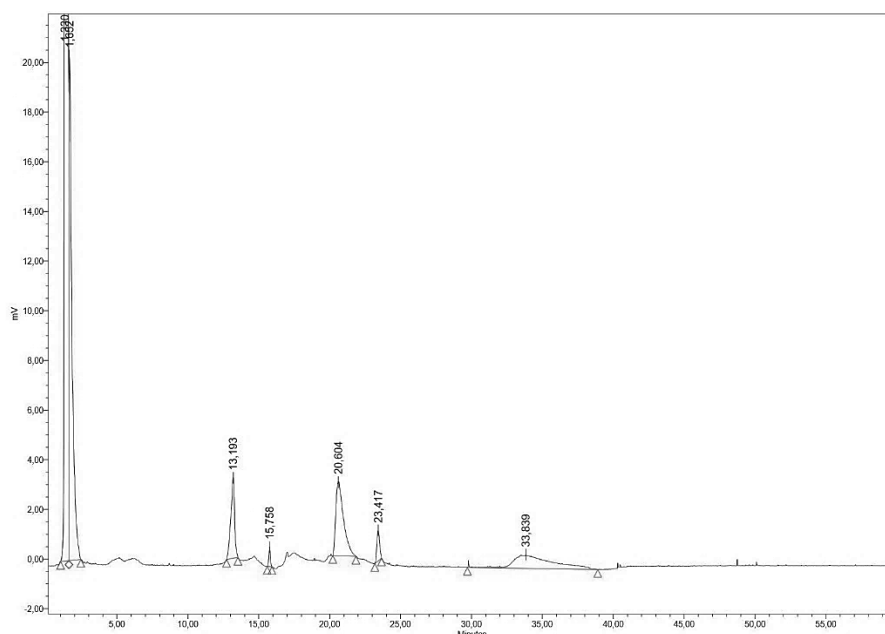
5.2 LC-ELSD-menetelmän kehitys ja optimointi

Fosfolipidien määrittämiseen kehitetystä kolme liuotinta sisältäneestä menetelmästä kehitettiin laiteteknisistä syistä kaksi liuotinta sisältävä menetelmä. Kolme liuotinta sisältäneen menetelmän ajo-ohjelma ja liuottimet on kuvattu taulukossa 6 (polar_16). Ajo-ohjelmaa ja liuoksia muuttamalla saatiin kehitettyä menetelmä, jolla pooliset lipidit,

erityisesti fosfolipidit, saatiin määritettyä käyttäen vain kahta liuotinta. Kehitetty menetelmä on kuvattu taulukossa 7 (polar_jk2A). Määrittämällä samoja näytteitä useita kertoja tutkittiin menetelmän toistettavuutta. Menetelmä todettiin retentioaikojen perusteella kohtuullisen toistettavaksi.

Lesitiini-näytteen kromatogrammi polar_jk2A-ohjelmalla määritettynä on kuvassa 15. TAG eluoitui ensimmäisenä, retentioajalla 1,6 min. Detektorin vasteesta päätellen TAG:a oli myös eniten. Fosfo- ja glykolipidejä eluoitui retentioajoilla 13,2, 15,8, 20,6 ja 23,4 min. TAG:n retentoituminen on tunnistettu standardilla aiemmissa tutkimuksissa. Fosfo- ja glykolipidien yhdistekohtaista retentoitumisjärjestystä ei voitu tarkasti määrittää kunnollisen standardin, jonka sisältö ja pitoisuudet tunnettaisiin, puutteen vuoksi.

Taulukossa 8 on esitetty muutamien eri näytteiden yhdisteiden retentioaikoja. Tässä havaittiin sama kuin lesitiini-näytteessä: TAG eluoitui ensimmäisenä, jonka jälkeen eluoituivat fosfo- ja glykolipidit. Retentioajat pysyivät samana huolimatta määritettävästä näyttemateriaalista tai määrittäyspäivästä.



Kuva 15. Lesitiini-näytteen kromatogrammi polar_jk2A-ohjelmalla määritettynä.

Taulukko 8. Menetelmän kehitysvaiheen tuloksia eri yhdisteiden retentioajoista eri näytteissä. Taulukossa on esitetty eri näytteiden ja eri määrittäyspäivien retentioaikoja TAG:lle sekä poolisille yhdisteryhmille, joiden tarkkaa yhdistekohtaista retentoitumisjärjestystä ei voitu määrittää standardin puutteen vuoksi.

Näyte	Määrittäyspäivä	Retentioaika (min)				
		TAG	Yhdiste-ryhmä 1	Yhdiste-ryhmä 2	Yhdiste-ryhmä 3	Yhdiste-ryhmä 4
Lesitiini, kokonaisuute	21.4.2017	1,652	13,193	15,758	20,604	23,417
Lesitiini, SPE-erotuksen fraktio 3	21.4.2017		13,229	15,790		
Lesitiini, SPE-erotuksen fraktio 4	21.4.2017			15,776	20,458	23,396
Kaura, kokonaisuute	27.4.2017	1,684	13,566	15,977	20,649	23,522
<i>E. gracilis</i> , kokonaisuute	27.4.2017	1,671		15,911	20,470	

5.3 Standardien ja mikrolevänäytteiden MS-määrittysten yhdisteet ja niiden msms-ionit

LC-ELSD:lla optimoidun ajo-ohjelman soveltamisessa massaspektrometrille oli ongelmia, sillä yhdisteiden retentioajat vaihtelivat eikä alkuun saatu aikaan toistettavia tuloksia. Lopulta kuitenkin saatiin toistettavat retentioajat PE ja phosphomix-standardeille, Aromtech ja *E. gracilis* -levänäytteille sekä kaura-näytteelle. MS-tunnistuksessa käytettiin APCI-ionisaatiolähdettä sekä positiivisella että negatiivisella ionisaatiolla.

5.3.1 Standardien yhdisteet ja niiden msms-ionit

PE-standardi

Negatiivisella ionisaatiolla PE-standardin retentioajat olivat kohtuullisen toistettavia. Retentioajalla 15,60 min eluoituneen yhdisteen (m/z 868) msms-ionikromatogrammissa havaittiin pääpilkeioni m/z 687. Retentioajalla 16,10 min eluoituneen yhdisteen (m/z 801) msms-ionikromatogrammissa havaittiin pääpilkeioni m/z 620. Molemmassa tapauksissa molekyyli-ionista irtosi 181 Da:n kokoinen fragmentti, mikä voisi viitata siihen, että yhdisteet olivat eri rasvahappoja sisältäviä MGDG:ja. Retentioajalla 19,20–19,70 min havaittiin intensiteetiltään suuri, levinnyt piikki, jolloin eluoitui useita eri yhdisteitä. Kokonaisionikromatogrammissa havaittiin yhdiste m/z 728, jonka msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 463, 309 ja 281, sekä yhdiste m/z 700, jonka msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 436, 402 ja 281. Nämä viittaavat PE-yhdisteisiin, joihin on kiinnittyneenä eri rasvahapot.

Positiivisella ionisaatiolla PE-standardin retentioaikojen toistettavuus oli hyvä. Retentioajalla 15,60 min eluoituneen yhdisteen (m/z 820) msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 657 ja 264. Retentioajalla 16,10 min eluoituneen yhdisteen (m/z 836) msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 655 ja 264. Samassa ajassa eluoituneiden yhdisteiden (m/z 810 ja 648) msms-ionikromatogrammeissa havaittiin ionit m/z 648, 629 ja 264 sekä ionit m/z 629, 617 ja 264. Yhdisteet olivat samoja kuin negatiivisella ionisaatiolla havaitut. Yhdisteiden voidaan olettaa olevan samaa yhdisteryhmää, sillä kaikista molekyyli-ioneista irtosi 181 Da:n kokoinen fragmentti ja kaikilla yhdisteillä havaittiin rasvahappoon viittaava ioni m/z 264. Molekyyli-ioneista $[M+H]^+$ m/z 810 ja 648 irtosi 162 Da:n kokoinen fragmentti. Nämä kaikki viittaavat siihen, että yhdisteet olivat eri rasvahappoja sisältäviä MGDG:ja, samoin kuin negatiivisen ionisaation havainnot viittaavat. Retentioajalla 19,20–20,10 min havaittiin intensiteetiltään suuri, levinnyt piikki, kuten negatiivisellakin ionisaatiolla, jolloin eluoitui useita yhdisteitä. Kokonaisionikromatogrammissa havaittiin yhdiste m/z 730, jonka msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 711, 391 ja 339, yhdiste m/z 770, jonka msms-ionikromatogrammissa havaittiin ioni m/z 628, yhdiste m/z 746, jonka msms-ionikromatogrammissa havaittiin ioni m/z 605, sekä yhdiste m/z 718, jonka msms-ionikromatogrammissa havaittiin ioni m/z 577. Kaikista molekyyli-ioneista irtosi 142 Da:n kokoinen fragmentti, mikä viittaa eri rasvahappoja sisältäviin PE-yhdisteisiin.

Phosphomix

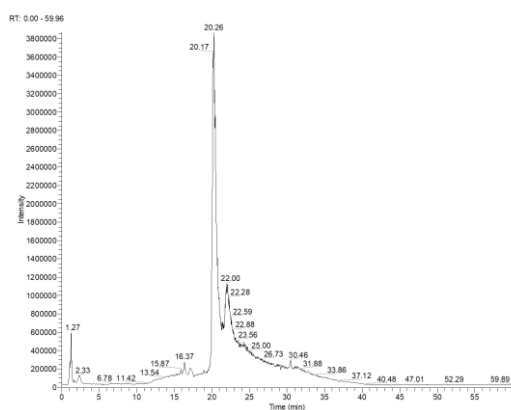
Negatiivisella ionisaatiolla Phosphomix-standardin toistettavuus ja yhdisteiden erottuminen olivat huonoja. Huono toistettavuus havaittiin rinnakkaismääritysten retentioaikojen vaihteluna, esimerkiksi eri määrityskerroilla sama yhdiste eluoitui retentioajoilla 20,23, 19,95 ja 20,01 min sekä toinen yhdiste retentioajoilla 21,97, 21,72 ja 21,68 min. Retentioajalla 15,70 min eluoituneen yhdisteen (m/z 884) msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 721, 708, 623 ja 286. Retentioajalla 16,20 min eluoituneen yhdisteen (m/z 824) msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 779, 705, 691, 640 ja 264. Retentioajalla 20,00 min havaittiin suuri yhdisteryhmä, jossa suurin intensiteetti oli yhdisteellä m/z 742 sekä hieman pienempi intensiteetti yhdisteellä m/z 716. Kokonaisionikromatogrammista nähtiin, että ajan kuluessa eluoitui molekyylilikooltaan pienempiä yhdisteitä: m/z 742 \rightarrow 740 \rightarrow 738 ja m/z 716 \rightarrow 714. Tämä johtui siitä, että yhdisteiden rasvahappojen tyydyttymättömyysaste kasvoi. Yhdisteen m/z 714 msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 452 ja 279, ja yhdisteen m/z 738 msms-

ionikromatogrammissa havaittiin ioni m/z 279. Kyseiset ionit viittaavat vahvasti PE-yhdisteisiin. Retentioajalla 21,70 min eluoituneen yhdisteen (m/z 746) msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 452, 311, 293 ja 255.

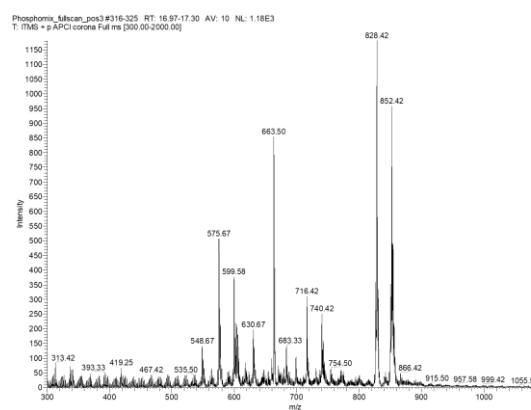
Phosphomix-standardin yhdisteiden erottuminen oli huonoa positiivisella ionisaatiolla eivätkä piikit erottuneet kunnolla toisistaan (kuva 16). Kokonaisionikromatogrammissa havaittiin retentioajalla 17,00 min suurimpana intensiteettinä yhdiste m/z 828 (kuva 17). Retentioajalla 19,90 min havaittiin suurimpana intensiteettinä yhdiste m/z 744 (kuva 18). Kokonaisionikromatogrammista nähtiin, että ajan kuluessa eluoitui molekyylikooltaan pienempiä yhdisteitä: m/z 744 \rightarrow 742 \rightarrow 740 ja m/z 718 \rightarrow 716 \rightarrow 714 (kuvat 19 ja 20). Samoin kuin negatiivisella ionisaatiolla, viittaa tämä yhdisteiden rasvahappojen tyydyttymättömyysasteen kasvuun. Kyseiset molekyyli-ionit viittaavat PE-yhdisteisiin. Retentioajalla 22,00 min eluoituivat yhdisteet m/z 730 (intensiteetiltään suurin), 754 ja 782. Lisäksi samassa ajassa eluoituivat yhdisteet m/z 599 ja 575, jotka ovat todennäköisesti PE:n hajoamistuotteita. Samat yhdisteet m/z 599 ja 575 havaittiin myös retentioajalla 24,00 min. Tämä viittaa siihen, että PE on hajonnut määrityksen aikana ja siitä on lohjennut pois rasvahappo. Retentioajalla 24,00 min havaittiin lisäksi m/z 768, jonka msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 749, 669 ja 626.

Kaura-näyte

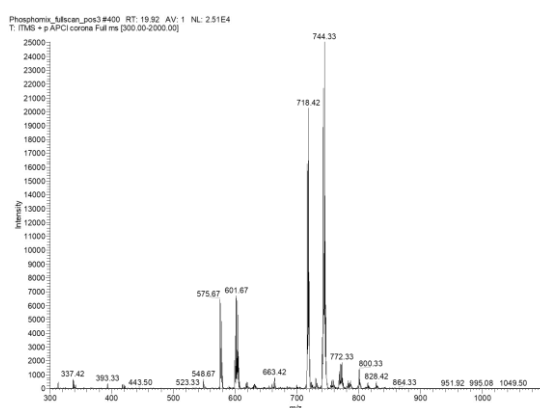
Kaura-näytteen yhdisteiden erottuminen ja retentioaikojen toistettavuus olivat kohtuulliset negatiivisella ionisaatiolla. Retentioajalla 15,37 min eluoituivat yhdisteet m/z 901 (intensiteetiltään suurin), 842, 840 ja 827. Retentioajalla 18,58 min eluoituivat yhdisteet m/z 1276 (intensiteetiltään suurin), 1252 ja 996. Retentioajalla 19,23 min eluoituivat yhdisteet m/z 975 (intensiteetiltään suurin), 1002 ja 915. Retentioajalla 20,17 min eluoituivat yhdisteet m/z 1014 (intensiteetiltään suurin), 955, 740 ja 714, joista kahden jälkimmäisen msms-ionikromatogrammeissa havaittiin pääpilkeioni m/z 279. Retentioajalla 21,63 min eluoituneen yhdisteen (m/z 736) msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 686 ja 378. Lisäksi samassa ajassa havaittiin yhdisteet m/z 677, 653 ja 712, joista viimeisen msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 472 ja 279.



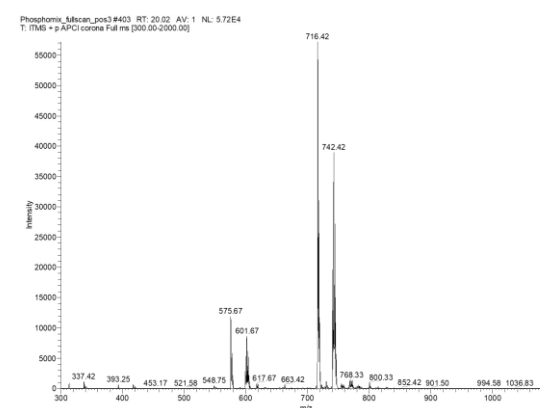
Kuva 16. Phosphomix-näytteen kokonaisionikromatogrammi positiivisella ionisaatiolla APCI-ionisaatiolähteellä.



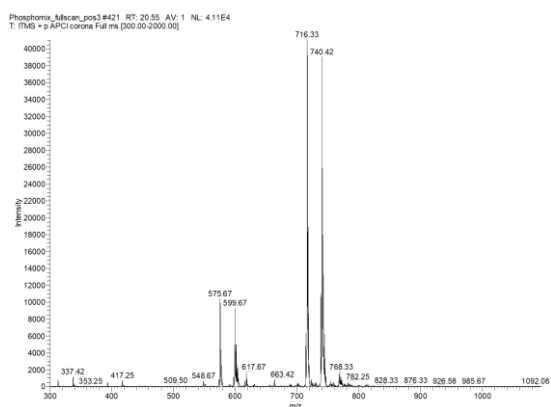
Kuva 17. Phosphomix-näytteen kokonaisionikromatogrammi positiivisella ionisaatiolla retentioajalla 17,00 min.



Kuva 18. Phosphomix-näytteen kokonaisionikromatogrammi positiivisella ionisaatiolla retentioajalla 19,90 min.



Kuva 19. Phosphomix-näytteen kokonaisionikromatogrammi positiivisella ionisaatiolla retentioajalla 20,02 min.



Kuva 20. Phosphomix-näytteen kokonaisionikromatogrammi positiivisella ionisaatiolla retentioajalla 20,55 min.

Positiivisella ionisaatiolla kaura-näytteessä havaittiin TAG suurena pitoisuutena, mutta muiden yhdisteiden erottuminen oli huonoa, samoin kuin oli Aromtechin ja HAMK:n toimittamien levänäytteiden positiivisella ionisaatiolla. Kaura-näytteessä eluoituivat retentioajalla 15,80 min yhdisteet m/z 680 (intensiteetiltään suurin) ja 682, jonka msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 663 ja 645. Retentioajalla 16,60 min eluoituivat yhdisteet m/z 740 (intensiteetiltään suurin) ja 716. Nämä olivat tyypillisiä molekyyli-ioneja PE:lle, mutta eluoitumisaika oli epätyypillinen standardeihin verrattuna. Retentioajalla 19,10 min eluoituneen yhdisteen (m/z 618) msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 599 ja 525. Lisäksi samalla retentioajalla 19,10 min eluoituivat yhdisteet m/z 620, 616, 602 ja 575, joiden msms-ionikromatogrammeissa havaittiin samassa järjestyksessä m/z 601 ja 527, m/z 597 ja 523, m/z 545 ja 527, sekä m/z 313 ja 263. Yhdisteet m/z 620, 618 ja 616 vaikuttivat kuuluvan samaan yhdisteryhmään, sillä niistä kaikista lohkesi 18 Da:n ja 92 Da:n kokoiset fragmentit. Yhdisteryhmä vaikuttaa samalta kuin Aromtechin ja HAMK:n toimittamien levänäytteiden positiivisella ionisaatiolla havaitut yhdisteryhmät retentioajalla 19,40 min.

5.3.2 Mikrolevänäytteiden yhdisteet ja niiden msms-ionit

Aromtechin toimittama *E. gracilis* -näyte

Aromtechin toimittaman uutetun *E. gracilis* -mikrolevänäytteen toistettavuus ja erottuminen olivat hyviä negatiivisella ionisaatiolla. Esimerkiksi erään yhdisteen retentioajat olivat 15,39, 15,29 ja 15,26 min, joten toistettavuus oli hyvä verrattuna esimerkiksi phosphomix-standardin toistettavuuteen. Retentioajalla 15,29 min eluoituneen yhdisteen (m/z 809) msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 747, 279 ja 251. Muita saman yhdisteryhmän yhdisteitä havaittiin m/z -arvoilla 807 ja 805, joilla nähtiin sama 62 Da:n kokoisen fragmentin irtoaminen. Lisäksi retentioajalla 15,29 min eluoituivat yhdisteet m/z 797 ja 795, joista jälkimmäisen msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 733, 277 ja 265. Tässä nähtiin sama 62 Da:n kokoisen fragmentin irtoaminen kuin yllä. Retentioajalla 16,34 min eluoituivat yhdisteet m/z 785 (intensiteetiltään suurin), 838, 824, 798 ja 766. Retentioajalla 19,36 min eluoituivat yhdisteet m/z 970 (intensiteetiltään suurin), 944, 911 ja 885. Retentioajalla 27,12 min eluoituivat m/z 765 sekä molekyylikooltaan pienemmät yhdisteet m/z 400 ja 341.

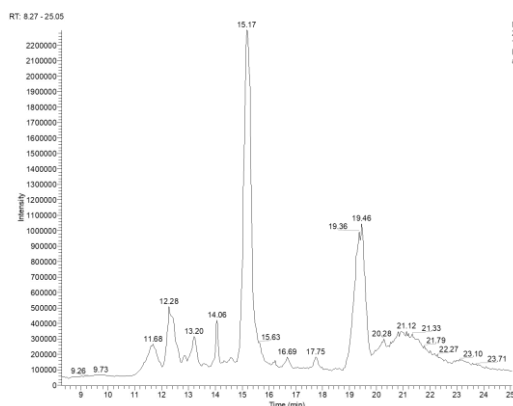
Aromtechin toimittaman *E. gracilis* -mikrolevän retentioaikojen toistettavuus ja yhdisteiden erottuminen olivat heikompia positiivisella ionisaatiolla kuin vastaavalla negatiivisella ionisaatiolla. Retentioajalla 15,29 min eluoituneen yhdisteen (m/z 587) msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 569 ja 495, ja samassa ajassa eluoituneen yhdisteen (m/z 585) msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 567 ja 493. Kummastakin yhdisteestä lohkesi 18 Da:n ja 92 Da:n kokoiset fragmentit, joten kyseessä oli saman yhdisteryhmän eri rasvahappoja sisältävät yhdisteet. Retentioajalla 16,34 min eluoituivat yhdisteet m/z 710 (intensiteetiltään suurin), 738, 663, 587 ja 548. Tulokset ovat hämmäntäviä, sillä m/z 738 ja 710 viittaavat PE-yhdisteisiin, mutta muilla näytteillä PE eluoitui noin retentioajalla 20 min. Retentioajalla 19,34 min suurimpana intensiteettinä havaittiin m/z 589. Lisäksi samassa ajassa eluoituivat yhdisteet m/z 587, 585 ja 573, joiden msms-ionikromatogrammeissa havaittiin ionit m/z 569 ja 495, m/z 567 ja 493, sekä m/z 555 ja 481, tässä järjestyksessä. Kaikista näistä yhdisteistä lohkesi 18 Da:n ja 92 Da:n kokoiset fragmentit, joten yhdisteet kuuluivat samaan yhdisteryhmään. Lisäksi näillä yhdisteillä havaittiin molekyylikokojen laskeminen parillisesti ajan suhteen samaan tapaan kuin Phosphomix-standardilla, mikä viittaa rasvahappojen tyydyttymättömyysasteen kasvuun. Fragmentaation perusteella kyseessä olivat samat yhdisteet kuin retentioajalla 15,29 min eluoituneet yhdisteet. Retentioajalla 20,95 min eluoituneet yhdisteet m/z 740, 718, 704, 690 ja 575 viittaavat PE:in. Muihin näytteisiin verrattuna Aromtechin toimittamassa *E. gracilis* -näytteessä PE eluoitui noin minuutin myöhemmin, ja lisäksi osa eluoitui jo 16 minuutin kohdalla.

HAMK:n toimittama *E. gracilis* 3 -näyte

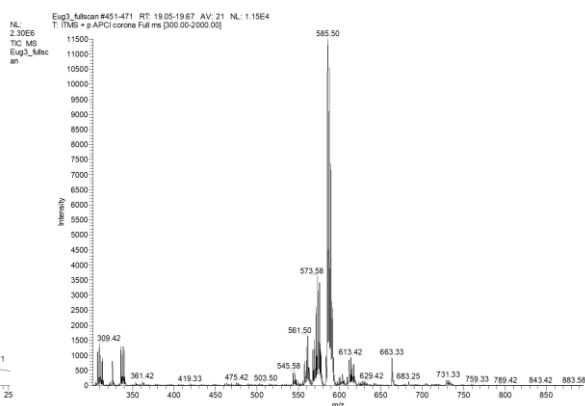
HAMK:n toimittaman *E. gracilis* 3 -mikrolevänäytteen yhdisteiden erottuminen ja retentioaikojen toistettavuus olivat kohtuulliset negatiivisella ionisaatiolla. Retentioajalla 14,65 min eluoituneen yhdisteen (m/z 801) msms-ionikromatogrammissa havaittiin pääpilkeioni m/z 504. Lisäksi samassa ajassa eluoitui m/z 787, jonka msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 739 ja 281. Retentioajalla 15,46 min eluoituneen yhdisteen (m/z 805) msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 743, 277 ja 247. Lisäksi samassa ajassa eluoituivat yhdisteet m/z 832, 809 ja 795, joiden msms-ionikromatogrammeissa havaittiin ionit m/z 770 ja 303, m/z 747 ja 277, sekä m/z 733 ja 277, tässä järjestyksessä. Kaikista näistä yhdisteistä lohkesi 62 Da:n kokoinen fragmentti, joten yhdisteet kuuluivat samaan yhdisteryhmään. Retentioajalla 16,85 min eluoitui m/z 715, jonka msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 505 ja 255. Samat msms-ionit

(m/z 505 ja 255) havaittiin toisenkin yhdisteen, m/z 769, msms-määrittelyssä. Voidaan päätellä, että näissä yhdisteissä oli samanlaisia rakenteita ja ne kuuluivat samaan yhdisteryhmään. Retentioajalla 17,85 min eluoituivat yhdisteet m/z 990 (intensiteetiltään suurin), 955 ja 550. Retentioajalla 19,56 min eluoituivat yhdisteet m/z 966 (intensiteetiltään suurin), 956, 942, 909 ja 717. Näiden yhdisteiden tunnistaminen oli haastavaa, sillä vastaavia yhdisteitä vastaavassa retentioajassa ei havaittu standardeissa. Retentioajalla 20,21 min eluoituneen yhdisteen (m/z 710) msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 303 ja 227. Lisäksi samassa ajassa eluoituivat yhdisteet m/z 966 ja 738, joista jälkimmäisen msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 303 ja 255.

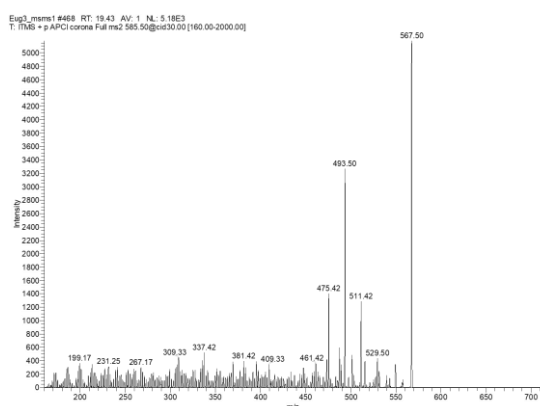
HAMK:n toimittaman *E. gracilis* 3 -mikrolevänäytteen positiivisen ionisaation kokonaisionikromatogrammi on esitetty kuvassa 21. Positiivisella ionisaatiolla retentioaikojen toistettavuus ja yhdisteiden erottuminen olivat heikompia kuin vastaavan negatiivisen ionisaation, samoin kuin havaittiin Aromtechin toimittamassa levänäytteessäkin. Retentioajalla 15,17 min eluoituneen yhdisteen (m/z 585) msms-ionikromatogrammissa havaittiin ionit m/z 567 ja 493 (kuva 23). Lisäksi samassa ajassa eluoituivat yhdisteet m/z 613, 587 ja 571, joiden msms-ionikromatogrammeissa havaittiin ionit m/z 595 ja 521, m/z 569 ja 495, sekä m/z 553 ja 479, tässä järjestyksessä. Kaikista yhdisteistä lohkesi 18 Da:n ja 92 Da:n kokoiset fragmentit, joten yhdisteet kuuluivat samaan yhdisteryhmään. Retentioajalla 19,46 min (kuva 22) havaittiin samoja yhdisteitä kuin ajassa 15,17 min: m/z 613, 587 ja 585. Kyseisten yhdisteiden msms-hajoaminen tuotti samoja ioneja kuin havaittiin retentioajalla 15,17 min eluoituneilla yhdisteillä. Lisäksi retentioajalla 19,46 min eluoituivat yhdisteet m/z 573 ja 561, jotka kuuluivat myös samaan yhdisteryhmään msms-hajoamisen perusteella (m/z 555 ja 481, m/z 542 ja 468, tässä järjestyksessä). Samoja yhdisteitä havaittiin Aromtechin toimittaman *E. gracilis* -näytteen positiivisen ionisaation tuloksissa retentioajalla 19,36 min.



Kuva 21. HAMK *E. gracilis* 3 kokonais-ionikromatogrammi positiivisella ionisaatiolla APCI-ionisaatiolähteellä.



Kuva 22. HAMK *E. gracilis* 3 kokonaisionikromatogrammi positiivinen ionisaatio retentioajalla 19,46 min.



Kuva 23. HAMK *E. gracilis* 3 ionin m/z 585 msms-ionikromatogrammi retentioajalla 19,43 min.

5.3.3 Poolisten lipidien rakenteiden ja rasvahappojen tunnistaminen MS-tulosten perusteella

MS-tulosten tulkinnessa ja yhdisteiden tunnistamisessa on hyödynnetty menetelmien kohdassa 4.5 mainittuja lähteitä. MS-määrittelyn positiivisella ionisaatiolla saatiin tietoa poolisten yhdisteiden lipidiluokista, kun yhdisteelle tunnusomainen fosfaattiryhmä tai galaktoosi irtosi. Negatiivisella ionisaatiolla saatiin tietoa yhdisteisiin kiinnittyneistä rasvahapoista. Yhdistämällä näitä tietoja voitiin tunnistaa näytteissä havaittuja yhdisteitä. Kaikki massaspektrometrinen analysoinnin tulokset huomioon ottaen näyttää siltä, että uudella, kehitetyllä ajo-ohjelmalla polar_jk2A määritettynä MGDG eluoitui retentioajalla 16 min ja PE eluoitui retentioajalla 20 min. Muut fosfolipidit eluoituivat PE:n kanssa osittain päällekkäin tai välittömästi PE:n jälkeen.

MGDG:n tunnistaminen

MGDG tunnistettiin positiivisen ionisaation karakteristisella hajoamisella $[M+H]^+-181$, jolloin galaktoosi irtosi molekyyli-ionista. PE-standardissa havaittu yhdiste m/z 812 (retentioaika 15,30 min) oli 18:1/20:0-MGDG. Kyseisen yhdisteen msms-spektrissä havaittiin $[DAG]^+$ -ioni m/z 631 ($[M+H]^+-181$), jonka perusteella yhdisteen voitiin päätellä olevan MGDG. Rasvahappokoostumus voitiin päätellä msms-spektrissä havaitusta $[RCO]^+$ -ionista m/z 265, joka on tyypillinen öljyhapolle. Kirjallisuusosiossa kuvissa 6 ja 7 on kuvattu MGDG:n rasvahappojen irtoamisen reaktiomekanismi. PE-standardissa havaittu yhdiste m/z 810 (retentioaika 16,10 min) oli 18:2/20:0-MGDG. Kyseisen yhdisteen msms-spektrissä havaittiin $[DAG]^+$ -ioni m/z 629 ($[M+H]^+-181$), jonka perusteella yhdisteen voitiin päätellä olevan MGDG. Rasvahappokoostumus voitiin päätellä msms-spektrissä havaitusta $[RCO]^+$ -ionista m/z 264, joka on tyypillinen linolihapolle. PE-standardissa MGDG siis eluoitui aikaisimmillaan retentioajalla 15,30 min ja eluoituminen jatkui retentioaikaan 16,10 min saakka. Kaura-näytteen tuloksissa havaittiin samoin MGDG:n eluoituminen noin 16 min kohdalla. Kaura-näytteessä havaittiin retentioajalla 16,37 min yhdiste m/z 827, joka osoittautui msms-spektrissä MGDG:ksi $[DAG]^+$ -ionin m/z 646 perusteella. Kaura-näytteessä havaittiin lisäksi muita, molekyylikooltaan suuria, tunnistamattomia yhdisteitä, jotka eluoituivat samanaikaisesti, joten kaura-näytteen MGDG:sta ei ole tarkempaa tietoa.

Aromtechin toimittamassa *E. gracilis* -mikrolevänäytteessä havaittu yhdiste m/z 809 (retentioaika 15,29 min) oli 18:2/20:0-MGDG. Kyseisen yhdisteen msms-spektrissä havaittu $[ROO]^-$ -ioni m/z 279 on tyypillinen linolihapolle. Samalla retentioajalla havaittu yhdiste m/z 805 oli 18:3/20:1-MGDG, jonka msms-spektrissä havaittiin α -linoleenihapolle ominainen $[ROO]^-$ -ioni m/z 277. Kummassakin yllä kuvatussa MGDG:ssa havaittiin mielenkiintoinen 62 Da lohkeaminen molekyyli-ionista. Esimerkiksi yhdisteen m/z 809 msms-spektrissä havaittiin m/z 747. *E. gracilis* -mikrolevänäytteessä havaittiin samoja MGDG:ja kuin Aromtechin toimittamassa näytteessä. Retentioajalla 15,46 min havaittu yhdiste m/z 809 oli 18:2/20:0-MGDG ja samalla retentioajalla havaittu yhdiste m/z 805 oli 18:3/20:1-MGDG. Lisäksi havaittiin yhdiste m/z 832, joka oli 18:1/20:4-MGDG. Kyseisen yhdisteen msms-spektrissä havaittiin arakidonihapolle tyypillinen $[ROO]^-$ -ioni m/z 303. Kaura-näytteessä havaittiin vastaavia molekyyli-ioneja ja msms-hajoamista, mikä vahvistaa mikrolevänäytteiden tunnistukset.

PE:n tunnistaminen

PE tunnistettiin positiivisen ionisaation karakteristisella hajoamisella $[M+H]^+-141$. PE-standardissa havaittu yhdiste m/z 770 oli PE, joka sisälsi eikosatrieenihapon ja steariinihapon. Tämän yhdisteen msms-spektrissä havaittiin $[DAG]^+$ -ioni m/z 628, jonka perusteella molekyyli-ionin voitiin päätellä olevan PE-yhdiste. Lisäksi msms-spektrissä havaittiin $[M+H-R_2CH=C=O]^+$ m/z 503, joka on karakteristinen 20:3/18:0-PE:lle, sekä steariinihapolle karakteristinen $[RCOO+58]^+$ m/z 342. Kirjallisuudessa kuvassa 4 on kuvattu PE:n fragmentaation reaktiomekanismi. Yhdiste m/z 746 oli $[DAG]^+$ -ionin m/z 605 perusteella PE, samoin kuin yhdiste m/z 718 oli $[DAG]^+$ -ionin m/z 577 perusteella PE. Yhdiste m/z 746 sisälsi joko palmitiinihapon ja eikosadieenihapon tai palmitoleiinihapon ja arakidihapon. Yhdiste m/z 718 sisälsi joko öljyhapon ja palmitiinihapon, tai steariinihapon ja palmitoleiinihapon.

Phosphomix-standardissa havaitut yhdisteet m/z 744, 742 ja 740 olivat PE:ja, sillä kaikissa havaittiin positiivisella ionisaatiolla PE-karakteristisen ryhmän 141 irtoaminen. Näistä luetelluista molekyyli-ioneista hajosi $[DAG]^+$ -ionit m/z 603, 601 ja 599. Yhdiste m/z 740 sisälsi kaksi linolihappoa. Tämä havaittiin negatiivisen ionisaation msms-tuloksista, joissa havaittiin linolihapolle ominainen ioni m/z 279. Samoin yhdisteeseen m/z 748 kiinnittyneet arakidihappo ja palmitiinihappo saatiin selville negatiivisen ionisaation msms-tulosten perusteella: $[M-H-R_1CH=C=O]^-$ havaittiin palmitiinihapolle ominaisena ionina m/z 452, jossa molekyyli-ionista irtosi R_2 eli arakidihappo, ja jäljellä oli glyserolirunko+fosfaattiryhmä+ R_1 eli palmitiinihappo sekä lisäksi havaittiin arakidihapolle ominainen m/z 311 ja palmitiinihapolle ominainen m/z 255. Yhdisteiden m/z 718, 716 ja 714 todettiin olevan PE:ja, sillä positiivisella ionisaatiolla näistä molekyyli-ioneista oli hajonnut $[DAG]^+$ -ionit m/z 577, 575 ja 573. Yhdiste m/z 716 sisälsi palmitiinihapon ja linolihapon, sillä negatiivisen ionisaation msms-tuloksista havaittiin $[M-H-R_1CH=C=O]^-$ m/z 452, jossa molekyyli-ionista irtosi R_2 eli linolihappo ja jäljellä oli glyserolirunko+fosfaattiryhmä+ R_1 eli palmitiinihappo, sekä lisäksi havaittiin linolihapolle ominainen m/z 279. Phosphomix-standardissa havaittiin retentioaikavälillä 19,9–22 PE-yhdisteiden eluoituminen siten, että molekyylikooltaan suurimmat eluoituivat aluksi ja ajan kuluessa eluoituivat pienemmät. Siten yhdisteiden m/z 744, 742 ja 740 sekä m/z 718, 716 ja 714 tapauksissa rasvahappojen hiiliketjujen pituus säilyi samana, mutta tyydyttyneisyysaste nousi, mistä johtui molekyylikokojen laskeminen parillisesti ajan suhteen.

5.4 Mikrolevänäytteiden poolisten lipidien profiilit LC-ELSD-määrityksellä

LC-ELSD-määrityksen standardeina käytettiin lesitiini-, PE- ja phosphomix-liuoksia. Levänäytteinä oli kohdassa 3 esiteltyt *E. gracilis* -näytteet: Aromtechin toimittamat käsittelemätön leväuute sekä uuttojäännökset yhden ja kahden SFE-uuton jälkeen, Lahdessa kasvatetut kasvatuserät R1, R2 ja R3 sekä HAMK:n toimittamat erät 1 (valossa kasvanut) ja 4 (pimeässä kasvanut). Kaikista näytteistä määritettiin sekä kokonaisuute että SPE:lla erotetut fraktiot 1–4. Kaikille näytteille tehtiin kolme rinnakkaismääritystä. Ensimmäiset määritykset LC-ELSD:lla tehtiin kokonaisuutelle injektio-tilavuudella 5 µl ja fraktioille injektio-tilavuudella 10 µl, mutta määrityksissä ei havaittu vastetta näillä injektio-tilavuuksilla, joten fraktioiden injektio-tilavuudeksi asetettiin 20 µl ja lisäksi kolmesta rinnakkaisnäytteestä yksi päätettiin uuttaa 40 %-IPA-heptaaniin 10 %-IPA-heptaanin sijaan. Näillä toimilla pooliset lipidit saatiin näkymään. Kaikissa määritetyissä näytteissä, sekä standardeissa että mikrolevänäytteissä, havaittiin epäpuhtauksia retentioajalla 1,3 min.

PE-standardissa havaittiin MGDG retentioajalla 17,0 min ja PE ja muut fosfolipidit retentioajalla 20,9 min. Phosphomix-standardissa havaittiin PE ja muut fosfolipidit retentioajalla 21,8 min. Lesitiini-standardissa havaittiin MGDG retentioajalla 16,9 min ja PE ja fosfolipidit retentioajalla 21,7 min. Lesitiini-standardissa havaittiin lisäksi yhdisteryhmä retentioajalla 17,9 min, mikä voisi viitata DGDG:iin.

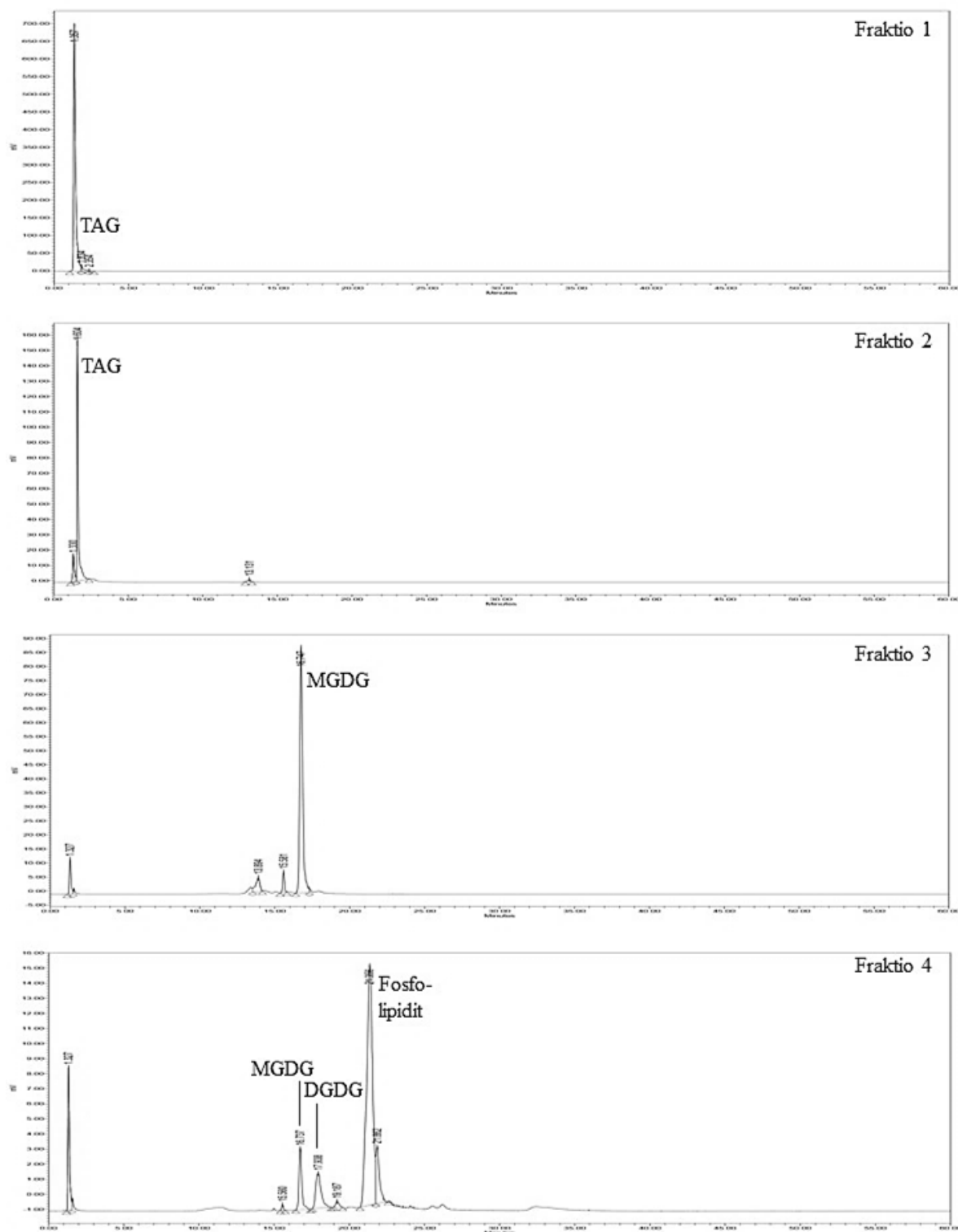
Kuvassa 24 on esitetty *E. gracilis* kasvatuserän R2 fraktioiden 1–4 LC-ELSD-kromatogrammit. Fraktioissa 1 ja 2 havaittiin vain TAG:a (retentioaika 1,6 min). Fraktiossa 3 havaittiin lähinnä MGDG:a (retentioaika 16,7 min). Fraktiossa 4 havaittiin MGDG:a (retentioaika 16,7 min), mahdollisesti DGDG:a (retentioaika 17,9 min) ja fosfolipidejä (retentioaika 21,4 min). Fosfolipidiryhmät eivät juurikaan erottuneet toisistaan vaan eluoituivat lähes samaan aikaan. Suurin osa fosfolipideistä eluoitui retentioajalla 21,4 min, mutta fosfolipidiyhdisteitä havaittiin myös retentioajalla 21,9 min, missä erottuminen oli kuitenkin vaillinaista. Vaikka yhdisteille ei tehtykään kvantitatiivista määritystä, kromatogrammien pinta-alojen perusteella glykolipidejä vaikuttaisi olevan enemmän kuin fosfolipidejä.

Muiden tutkittujen mikrolevänäytteiden LC-ELSD-tuloksissa ei ollut juurikaan eroa kuvassa 24 esitettyihin *E. gracilis* kasvatuserän R2 tuloksiin. HAMK:n toimittaman valossa kasvaneen kasvatuserän kokonaisuutteen ja fraktioiden 3 ja 4 kromatogrammit on esitetty kuvassa 25. *E. gracilis* Aromtechin toimittamissa kolmessa eri näytteessä, Lahdessa kasvatetuissa erissä R1 ja R3 sekä HAMK:n toimittamissa kahdessa eri näytteessä havaittiin yhdisteet samoin kuin *E. gracilis* kasvatuserässä R2: fraktioissa 1 ja 2 TAG retentioajalla 1,6 min, fraktiossa 3 MGDG retentioajalla 16,7–16,9 min ja fraktiossa 4 MGDG retentioajalla 16,7–16,9 min, mahdollinen DGDG retentioajalla 17,9–18,0 min, fosfolipidit retentioajalla 21,4 min ja 21,9 min. Retentioajalla 18,0 min havaittu yhdiste havaittiin kaikissa mikrolevänäytteissä ja se eluoitui säännönmukaisesti fraktiossa 4, kun taas MGDG eluoitui fraktiossa 3. Mikäli retentioajalla 18,0 min havaittu yhdiste on DGDG, sen määrä näytti olevan selkeästi pienempi kuin MGDG:n. Tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että MGDG oli tutkituissa mikrolevissä yleisin glykolipidi. Kromatogrammien perusteella fraktiossa 3 oli lähinnä glykolipidejä ja fraktiossa 4 lähinnä fosfolipidejä.

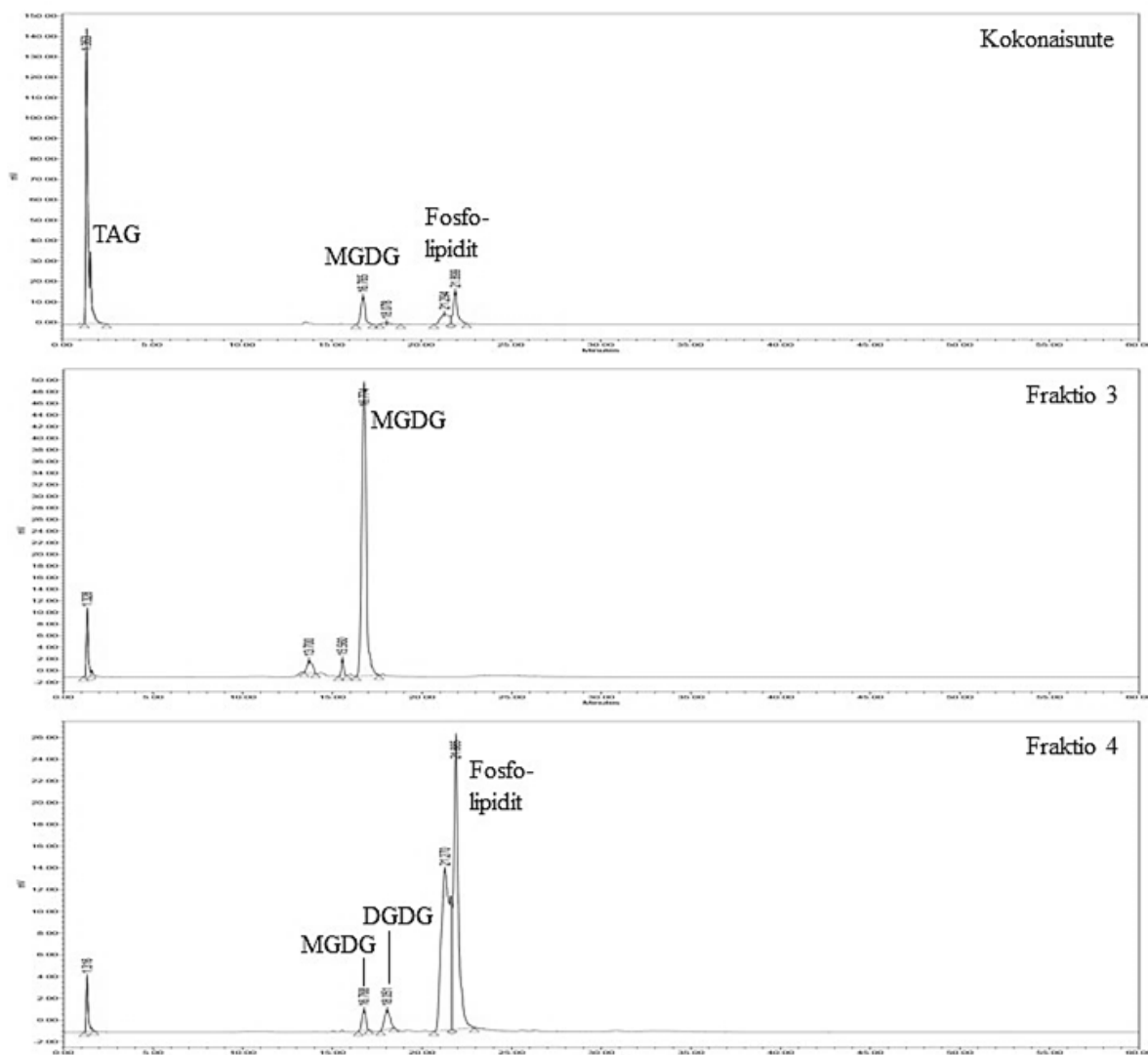
Mikrolevänäytteiden lipidiluokissa ei havaittu eroja LC-ELSD-tuloksissa. Standardien puutteen vuoksi yhdisteille ei tehty kvantitatiivista määrittystä, mutta kromatogrammien pinta-alojen perusteella voitiin arvioida lipidiluokkien suuruutta. Aromtechin toimittamissa kolmessa eri näytteessä (n=3) TAG:n määrä fraktioissa 1 ja 2 vaikutti vähenevän siten, että käsittelemättömässä uutteenäytteessä TAG:a oli eniten, uuttojäännöksessä yhden SFE-uuton jälkeen hieman vähemmän ja uuttojäännöksessä kahden SFE-uuton jälkeen vähiten. Yhden SFE-uuton jälkeisessä uuttojäännöksessä vaikutti olevan vähiten MGDG:a fraktiossa 3 ja vähiten DGDG:a ja fosfolipidejä fraktiossa 4. Käsittelemättömässä uutteenäytteessä vaikutti olevan toiseksi eniten ko. lipidiluokkia ja kahden SFE-uuton jälkeisessä uuttojäännöksessä vaikutti olevan eniten.

Lahdessa kasvatetut *E. gracilis* -kasvatuserät R2 ja R3 (n=3) vaikuttivat LC-ELSD-tuloksiltaan keskenään hyvin samantyyppisiltä. Ne vaikuttivat sisältävän keskenään suunnilleen saman verran TAG:a fraktioissa 1 ja 2, MGDG:a fraktiossa 3 ja MGDG:a, DGDG:a ja fosfolipidejä fraktiossa 4. Kasvatuserä R1 vaikutti sisältävän vähemmän kaikkia edellä lueteltuja lipidiluokkia kuin kasvatuserät R2 ja R3.

HAMK:n toimittamissa *E. gracilis* -näytteissä oli eroa valossa ja pimeässä kasvaneiden mikrolevien välillä (n=3). Pimeässä kasvaneet vaikuttivat sisältävän enemmän TAG:a sekä kokonaisuudessaan että fraktioissa 1 ja 2 kuin valossa kasvaneet. Pimeässä kasvaneet vaikuttivat sisältävän hieman vähemmän MGDG:a fraktiossa 3, hieman vähemmän DGDG:a fraktiossa 4 ja huomattavasti vähemmän fosfolipidejä fraktiossa 4 kuin valossa kasvaneet.



Kuva 24. *E. gracilis* -kasvatuserän R2 LC-ELSD kromatogrammit fraktioista 1–4 (n=3). Fraktioissa 1 ja 2 eluotui lähinnä TAG:a, fraktiossa 3 lähinnä glykolipidejä ja fraktiossa 4 lähinnä fosfolipidejä.



Kuva 25. HAMKin toimittaman *E. gracilis* valossa kasvaneen kasvatuserän LC-ELSD kromatogrammit kokonaisuutesta sekä fraktioista 3 ja 4 (n=3). Fraktiossa 3 eluutui lähinnä glykolipidejä ja fraktiossa 4 lähinnä fosfolipidejä.

6 Pohdinta

Tutkielman kokeellisen osan tulosten perusteella saatiin tietoa mikrolevien poolisten lipidien rasvahappojen määrästä ja laadusta sekä mikrolevien sisältämistä poolisista lipidiluokista. MS-määrittelyn avulla tunnistettiin poolisia lipidiluokkia ja saatiin tietoa niihin kiinnittyneistä rasvahapoista. Kun yhdistetään SPE:lla ja GC:lla saadut rasvahappotulokset, MS:lla saadut tunnistustulokset ja LC-ELSD:lla saadut levien lipidiluokkatulokset, voidaan selvittää mikrolevissä esiintyviä poolisia lipidejä ja niihin kiinnittyneitä rasvahappoja.

6.1 Mikrolevien rasvahappokoostumus ja poolisten lipidien rasvahapot

Tulosten perusteella SPE-erotus ja rasvahappojen määrittäminen vaikuttaa olevan luotettava menetelmä, sillä fraktioiden yhteenlasketun rasvahappopitoisuuden todettiin olevan lähes sama kuin kokonaisuutteen rasvahappopitoisuus. *Selenastrum* sp. -näytteissä fraktioiden yhteenlaskettu rasvahappopitoisuus oli jopa suurempi kuin kokonaisuutteen rasvahappopitoisuus, mikä voi selittyä huolellisemmalla työskentelyllä SPE-fraktioiden käsittelyssä.

Tulosten perusteella *Selenastrum* sp. (9 %) sisälsi enemmän lipidejä kuin *E. gracilis* (6 %). Kuitenkin molempien lajien rasvahappopitoisuus jäi aiemmin raportoituja pitoisuuksia pienemmiksi, sillä *Selenastrum* sp. -mikrolevän rasvahappopitoisuudeksi on saatu 12,5–18,2 % (Yan ym. 2011) ja *E. gracilis* -mikrolevän 9–24,6 % (Mahapatra ym. 2013, Schwarzhans ym. 2014). Toisaalta saadut rasvahappotulokset vastaavat hyvin Helsingin yliopistossa aiemmin saatuja *Selenastrum* sp. ja *E. gracilis* -mikrolevien tuloksia (Anttila 2017, Immonen 2017). *E. gracilis* -mikrolevän dokosaheksaeenihappopitoisuudeksi määritettiin 1,1–2,8 %. Tämä vastaa hyvin muissa tutkimuksissa saatuja arvoja 0–6,6 % (Lang ym. 2011, Schwarzhans ym. 2014). Tässä tutkimuksessa havaittiin, että molempien lajien kaikissa kasvatuseriissä suurin osa rasvahapoista oli SPE-erotuksen fraktioissa 3 ja 4, eli poolisissa lipideissä. Tästä voidaan päätellä, että tutkitut mikrolevälajit sisälsivät paljon poolisia lipidejä. Sitä vastoin muissa tutkimuksissa mikrolevien suurimman lipidiluokan on todettu olevan TAG (Bigogno ym. 2002, Breuer ym. 2012, Wang ja Wang 2012, Yao ym. 2015), mikä voi selittyä sillä, että kasvatusolosuhteet on optimoitu niin, että levät tuottavat mahdollisimman paljon TAG:a. Glyko- ja fosfolipidien osuuden kokonaisrasvasta on määritetty olevan 0,7–37 % (Wang ja Wang 2012, Yao ym. 2015).

Tässä tutkimuksessa molempien lajien rasvahappopitoisuuksissa ja -koostumuksissa havaittiin eroa kasvatuserien välillä. Vaikuttaa siltä, että kasvatusolosuhteet vaikuttivat lipidien rasvahappojen hiiliketjun pituuteen ja tyydyttyneisyysasteeseen, mutta ei juurikaan lipidiluokkien osuuksiin TAG-, glykolipidi- ja fosfolipidi-tasolla. Samoin on todettu muissakin tutkimuksissa (Regnault ym. 1995, Bigogno ym. 2002, Breuer ym. 2012, Griffiths ym. 2012, Martin ym. 2014, Schwarzhans ym. 2015).

Kun verrattiin LC-ELSD-tuloksia SPE-erotuksessa saatuihin tuloksiin, havaittiin lipidiluokissa pieniä eroja. LC-ELSD-tulosten perusteella voidaan päätellä, että fraktiot 1 ja 2 koostuivat TAG:sta, fraktio 3 pääasiassa MGDG:sta ja muista glykolipideistä ja fraktio 4 pääasiassa fosfolipideistä sisältäen myös jonkin verran glykolipidejä. Tämän perusteella vaikuttaa siltä, että glykolipidit olivat *Selenastrum* sp. -mikrolevän suurin poolisten lipidien luokka, sillä fraktion 3 rasvahappopitoisuus oli suurin kaikissa *Selenastrum* sp. -mikrolevän kasvatuserissä. *E. gracilis* -mikrolevän kasvatuserän R1 selkeästi suurin lipidipitoisuus oli fraktiossa 4, mikä viittaa suureen fosfolipidipitoisuuteen. Sen sijaan *E. gracilis* -mikrolevän kasvatuserässä R3 fraktioiden 3 ja 4 lipidipitoisuus oli suunnilleen yhtä suuri, mikä viittaa kyseisen kasvatuserän sisältäneen suunnilleen saman verran sekä glyko- että fosfolipidejä. Tulokset ovat ristiriidassa aiempien tutkimusten kanssa, sillä Kaouan ja Laval-Martinin (1995) sekä Ogawan ym. (2014) mukaan *E. gracilis* -mikrolevässä suurin poolisten lipidien luokka oli MGDG. *Selenastrum* sp. -mikrolevän kaikissa kasvatuserissä ja *E. gracilis* -mikrolevän kasvatuserässä R3 havaittiin, että fraktion 3 rasvahappokoostumus sisälsi huomattavasti enemmän monityydyttymättömiä ja pitkäketjuisia rasvahappoja verrattuna fraktioon 4, jossa oli pääasiassa tyydyttynyttä palmitiinihappoa sekä kertatyydyttymätöntä öljyhappoa. Lisäksi MS-määrittelyksissä MGDG:iin kiinnittyneenä havaittiin nimenomaan 18-hiilisiä monityydyttymättömiä sekä pitkäketjuisia rasvahappoja *E. gracilis* -mikrolevällä. Nämä havainnot voivat viitata siihen, että kyseisissä kasvatuserissä glykolipideihin oli kiinnittyneenä monityydyttymättömiä rasvahappoja, kuten linolihappoa ja α -linoleenihappoa, ja fosfolipideihin oli kiinnittyneenä tyydyttyneitä tai kertatyydyttymättömiä rasvahappoja. Samantyyppisiä tuloksia ovat saaneet Kaoua ja Laval-Martin (1995). *E. gracilis* -mikrolevän kasvatuserä R3 poikkesi muista kasvatuseristä fraktion 3 osalta, sillä kyseisen fraktion rasvahappopitoisuus oli hyvin matala eikä näyttänyt sisältävän erityisen paljon monityydyttymättömiä rasvahappoja. Sen sijaan fraktion 4 osalta *E. gracilis* -mikrolevän kasvatuserä R3 noudatti samoja piirteitä kuin muutkin kasvatuserät sisältäen paljon tyydyttynyttä palmitiinihappoa sekä kertatyydyttymättömiä palmitoleiinihappoa ja öljyhappoa.

6.2 Mikrolevien pooliset lipidiluokat

LC-ELSD-tulosten perusteella mikrolevien lipidiluokissa ei ollut kvalitatiivisesti määritettynä eroa lajien *Selenastrum* sp. ja *E. gracilis* tai kasvatuserien välillä. Kaikki tutkittavat mikrolevänäytteet sisälsivät TAG:a, MGDG:a, DGDG:a ja fosfolipidejä.

Tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että MGDG oli tutkituissa mikrolevissä yleisin glykolipidi ja PE yleisin fosfolipidi. Tulokset vastaavat aiempia tutkimuksia, joissa *E. gracilis* -mikrolevän on todettu sisältävän eniten MGDG:a (Kaoua ja Laval-Martin 1995, Ogava ym. 2014) ja toiseksi eniten PE:a (Ogava ym. 2014). Massaspektrometrinen määrittelyn perusteella tutkituissa mikrolevissä oli 18:1/20:4-MGDG:a, 18:2/20:0-MGDG:a ja 18:3/20:1-MGDG:a. Samankaltaisia tuloksia on saatu muissakin tutkimuksissa. Craigin ym. (2015) mukaan *E. gracilis* -mikrolevän MGDG sisältää 16-, 18- ja 20-hiiliketjuisia rasvahappoja. Eniten MGDG:n on todettu sisältävän α -linoleenihappoa ja heksadekatetraeenihappoa (Kaoua ja Laval-Martin 1995, Craig ym. 2015). Tämä vastaa hyvin tässä tutkimuksessa saatuja tuloksia, sillä sen lisäksi että massaspektrometrisessä määrittelyssä MGDG:n havaittiin sisältävän α -linoleenihappoa, SPE-erotuksessa ja rasvahappojen määrittelyssä havaittiin 16-, 18- ja 20-hiiliketjuisia rasvahappoja sekä nimenomaan *E. gracilis* -mikrolevän MGDG:lle tyypillistä heksadekatetraeenihappoa. SPE-erotuksessa ja rasvahappojen määrittelyssä suurin osa tutkittujen mikrolevänäytteiden rasvahapoista oli 16- ja 18-hiiliketjuisia rasvahappoja, mikä vastaa aiempia mikrolevätuloksia (Kaoua ja Laval-Martin 1995, McLarnon-Riches ym. 1998, Mahapatra ym. 2013, Axelsson ja Gentili 2014, Schwarzhans ym. 2014, Craig ym. 2015).

6.3 Tutkimuksen haasteita ja mahdollisia virhelähteitä

Määrittysten toistettavuuden kanssa oli haasteita läpi tutkimuksen. Retentioajat vaihtelivat määrittysmenetelmien välillä, eikä varsinaista syytä tähän löydetty. Toisinaan laitteistoissa oli hetkellisesti vikaa, mutta se ei selitä kaikkia vaihteluita. Yhtenä selityksenä pohdittiin myös sitä, että kolonni ei puhdistunut ja tasapainottunut riittävästi 20 minuutin aikana, mikä ajo-ohjelman loppuun oli ohjelmoitu. Ajan pitäisi kuitenkin olla varsin riittävä kolonnin tasapainottumiseen, sillä mm. Anesin ja Guellan (2015) kehittämässä poolisten lipidien erotusmenetelmässä diolikolonnin tasapainottumiseen oli varattu 10 min.

MS-tunnistuksessa ongelmaksi nousivat toistettavuus ja erottuminen. LC-MS-laitteisto ei nähtävästi tehnyt toistettavaa gradiettia, jonka vuoksi tulosten toistettavuus ja erottuminen olivat heikkoja. Polar_16-ajo-ohjelmassa oli 0,0–5,0 %:n virtaus vettä. Epäilyksenä oli, että LC-MS-laitteiston pumput eivät kyenneet pumppaamaan tätä pientä määrää vettä

toistettavasti. Ratkaisu jatkossa voisikin olla esimerkiksi vedestä ja isopropanolista tehty seos, jolloin veden osuus saataisiin nostettua ja laskettua gradientin aikana toistettavammin.

Tulosten suhteen yleisesti on huomioitava, että tulosaineistolle ei ole tehty tilastollisia analyysyjä ja näin ollen ei voida sanoa, ovatko mahdolliset erot mikrolevisä tilastollisesti merkitseviä. Tilastollisia analyysyjä ei tehty siitä syystä, että tutkimuksen päätavoitteena oli poolisten lipidiluokkien määrittäminen LC-ELSD-menetelmällä kvalitatiivisesti.

IV PÄÄTELMÄT

Tämän tutkielman tavoitteena oli luokitella mikrolevien sisältämät lipidit poolisuuden mukaan selvittäen osuudet rasvahappokoostumuksen perusteella. Lipidien luokittelussa hyödynnettiin SPE-erotusta. Saatujen rasvahappotulosten perusteella lipidien SPE-erotus poolisuudeltaan neljään eri fraktioon on luotettava menetelmä. Rasvahappomäärityksistä ilmeni, että tutkituista mikrolevälajeista *Selenastrum* sp. -mikrolevän kokonaislipidipitoisuus oli suurempi kuin *E. gracilis* -mikrolevän. Molemmilla lajeilla eniten rasvahappoja oli poolisissa lipideissä. *Selenastrum* sp. -mikrolevän poolisissa lipideissä yleisimmät rasvahapot olivat palmitiinihappo, öljyhappo, linolihappo ja α -linoleenihappo. *E. gracilis* -mikrolevän poolisissa lipideissä yleisimmät rasvahapot olivat palmitiinihappo, palmitoleiinihappo, heksadekadieenihappo, heksadekatrieenihappo, öljyhappo, linolihappo ja α -linoleenihappo. Molempien lajien rasvahappokoostumukset vaihtelivat kasvatuserästä ja -olosuhteista riippuen.

Tutkielman toisena tavoitteena oli kehittää HPLC-menetelmä mikrolevien fosfo- ja glykolipidien määrittämiseen ja kehitetyllä menetelmällä tutkia *Selenastrum* sp. ja *E. gracilis* -mikrolevien poolisten lipidien profiileja. Kehitetyllä menetelmällä MGDG eluoitui retentioajalla 16,8 min ja fosfolipidit retentioajalla 21,4 min. Fosfolipidiluokkia ei kyetty erottamaan toisistaan tällä menetelmällä. LC-ELSD-tekniikalla havaitut yhdisteet varmistettiin LC-MS-tekniikalla. Tutkituissa mikrolevälajeissa MGDG vaikuttaisi olevan yleisin glykolipidi ja PE yleisin fosfolipidi. Erot mikrolevälajeissa ja kasvatusolosuhteissa vaikuttivat lipidien rasvahappokoostumukseen, mutta eivät juurikaan poolisiin lipidiluokkiin. Tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että mikrolevien MGDG sisälsi

monityydyttymättömiä rasvahappoja, kun taas fosfolipidit sisälsivät tyydyttyneitä tai kertatyydyttymättömiä rasvahappoja.

Lisätutkimusta tarvitaan menetelmän kehittämiseen fosfolipidiluokkien erottamiseksi toisistaan. Tätä kautta mikrolevien pooliset lipidiluokat voitaisiin määrittää kvantitatiivisesti ja viedä tutkimusta eteenpäin selvittämällä eri poolisten lipidiluokkien rasvahappokoostumukset ja -pitoisuudet.

LÄHTEET

- Anesi A, Guella G. 2015. A fast liquid chromatography-mass spectrometry methodology for membrane lipid profiling through hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1384:44–52.
- Anttila P. 2017. Mikrolevien lipidien uuttaminen paineistetulla nesteuutolla. [pro gradu -tutkielma]. EKT-sarja 1822. Helsinki. Helsingin yliopisto, elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. 68 s. Saatavilla: <http://urn.fi/URN:NBN:fi:hulib-201712195963>.
- Axelsson M, Gentili F. 2014. A Single-Step Method for Rapid Extraction of Total Lipids from Green Microalgae. *PloS One* 9:2.
- Becker EW. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25:207–210.
- Becker EW. 2013. Microalgae for Human and Animal Nutrition. Teoksessa: Richmond A, Hu Q, toim. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. 2. p. Somerset, NJ, USA: John Wiley & Sons Ltd. s. 461–503.
- Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Boussiba S, Vonshak A, Cohen Z. 2002. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry* 60:497–503.
- Borowitzka MA. 2013. High-value products from microalgae – their development and commercialization. *Journal of Applied Phycology* 25:743–756.
- Breuer G, Lamers PP, Martens DE, Draaisma RB, Wijffels RH. 2012. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology* 124:217–226.
- Brügger B, Erben G, Sandhoff R, Wieland FT, Lehmann WD. 1997. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:2339–2344.
- Byrdwell WC. Lipidianalytiikka. Saatavilla: www.byrdwell.com. Viitattu: 21.10.2019.
- Cajka T, Fiehn O. 2014. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry* 61:192–206.
- Converti A, Casazza AA, Ortiz EY, Perego P, Del Borghi M. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing* 48:1146–1151.
- Craig EM, Dahmen JL, Leblond JD. 2015. Temperature modulation and the presence of C₂₀ fatty acid in mono- and digalactosyldiacylglycerol of *E. gracilis* and *Lepocinclis acus*: A modern interpretation of euglenid galactolipids using positive-ion electrospray ionization/mass spectrometry. *Phycological Research* 63:231–238.
- Cui Z, Thomas MJ. 2009. Phospholipid profiling by tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877:2709–2715.
- Cutignano A, Luongo E, Nuzzo G, Pagano D, Manzo E, Sardo A, Fontana A. 2016. Profiling of complex lipids in marine microalgae by UHPLC/tandem mass spectrometry. *Algal Research* 17:348–358.
- Gray CG, Lasiter AD, Li C, Leblond JD. 2009. Mono- and digalactosyldiacylglycerol composition of dinoflagellates. I. Peridinin-containing taxa. *European Journal of Phycology* 44:191–197.
- Griffiths MJ, van Hille RP, Harrison STL. 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology* 24:989–1001.
- Guella G, Frassanito R, Mancini I. 2003. A new solution for an old problem: the regiochemical distribution of the acyl chains in galactolipids can be established by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17: 1982–1994.
- Herrero M, Martín-Álvarez PJ, Señoráns FJ, Cifuentes A, Ibáñez E. 2005. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chemistry* 93(3):417–423.

- Hsu F-F, Turk J. 2009. Electrospray ionization with low-energy collisionally activated dissociation tandem mass spectrometry of glycerophospholipids: Mechanisms of fragmentation and structural characterization. *Journal of Chromatography B* 877:2673–2695.
- Hölzl G, Dörmann P. 2007. Structure and function of glycoglycerolipids in plants and bacteria. *Progress in Lipid Research* 46:225–243.
- Immonen M. 2017. Ylikriittinen hiilidioksidiuutto mikrolevien lipidien eristysmenetelmänä. [pro gradu - tutkielma]. EKT-sarja 1780. Helsinki. Helsingin yliopisto, elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. 74 s. Saatavilla: <http://urn.fi/URN:NBN:fi:hulib-201704263965>.
- Jiang Y, Chen F, Liang SZ. 1999. Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptocodinium Cohnii*. *Process Biochemistry* 34:633–637.
- Kaoua ML, Laval-Martin DL. 1995. Evolution of PS II α and PS II β centers during the greening of *E. gracilis* Z: Correlations with changes in lipid content. *Photosynthesis Research* 43:155–163.
- Ketola R, Kostiaainen R, Kotiaho T, Vainiotalo P. Massaspektrometrian perusteet. 1. p. Hakapaino, Helsinki 2010. 273 s.
- Kim YH, Choi J-S, Yoo JS, Park Y-M, Kim MS. 1999. Structural Identification of Glycerolipid Molecular Species Isolated from Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Using Fast Atom Bombardment Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* 267, 260–270.
- Kumari P, Kumar M, Reddy CRK, Jha B. 2013. Algal lipids, fatty acids and sterols. Teoksessa: Domínguez H, toim. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. 1. p. Oxford, UK. Cambridge, UK. Philadelphia, USA. New Delhi, India: Woodhead Publishing Limited. s 87–135.
- Lin J-T. 2005. HPLC Separation of Acyl Lipid Classes. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 30:2005–2020.
- McLarnon-Riches CJ, Rolph CE, Greenway DLA, Robinson PK. 1998. Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids. *Phytochemistry* 49(5):1241–1247.
- Mahapatra DM, Chanakya HN, Ramachandra TV. 2013. *E. sp.* as a suitable source of lipids for potential use as biofuel and sustainable wastewater treatment. *Journal of Applied Phycology* 25(3):855–65.
- Martin GJO, Hill DRA, Olmstead ILD, Bergamin A, Shears MJ, Dias DA, Kentish SE, Scales PJ, Botte CY, Callahan DL. 2014. Lipid Profile Remodeling in Response to Nitrogen Deprivation in the Microalgae *Chlorella* sp. (Trebouxiophyceae) and *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *PLoS ONE* 9(8):e103389.
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217–232.
- Milledge JJ. 2010. The challenge of algal fuel: economic processing of the entire algal biomass. *Condensed matter-materials engineering newsletter* 1(6):4–6.
- Mudimu O, Rybalka N, Bauersachs T, Friedl T, Schulz R. 2015. Influence of Different CO₂ Concentrations on Microalgae Growth, α -Tocopherol Content and Fatty Acid Composition. *Geomicrobiology Journal* 32(3–4):291–303.
- Murphy RC, Axelsen PH. 2011. Mass spectrometric analysis of long-chain lipids. *Mass Spectrometry Reviews* 30:579–599.
- Ogawa T, Furuhashi T, Okazawa A, Nakai R, Nakazawa M, Kind T, Fiehn O, Kanaya S, Arita M, Ohta D. 2014. Exploration of polar lipid accumulation profiles in *E. gracilis* using LipidBlast, an MS/MS spectral library constructed *in silico*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 78(1):14–18.
- Regnault A, Chervin D, Chammai A, Piton F, Calvayrac R, Mazliak P. 1995. Lipid composition of *E. gracilis* in relation to carbon-nitrogen balance. *Phytochemistry* 40(3):725–733.
- Riekkola M-L, Hyötyläinen T. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat. 2. p. Yliopistopaino, Helsinki 2002. 343 s.
- Roncarati A, Meluzzi A, Acciarri S, Tallarico N, Melotti P. 2004. Fatty Acid Composition of Different Microalgae Strains (*Nannochloropsis* sp., *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, *Nannochloris atomus*

- Butcher and *Isochrysis* sp.) According to the Culture Phase and the Carbon Dioxide Concentration. Journal of the World Aquaculture Society 35(3):401–411.
- Schwarzhan J-P, Cholewa D, Grimm P, Beshay U, Risse J-M, Friehs K, Flaschel E. 2015. Dependency of the fatty acid composition of *E. gracilis* on growth phase and culture conditions. Journal of Applied Phycology 27:1389–1399.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. 2006. Commercial Applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering 101:87–96.
- Takagi M, Karseno, Yoshida T. 2006. Effect of Salt Concentration on Intracellular Accumulation of Lipids and Triacylglyceride in Marine Microalgae *Dunaliella* Cells. Journal of Bioscience and Bioengineering 101(3):223–226.
- Tossavainen M. 2018. Microalgae – Platform for conversion of waste to high value products. [väitöskirja]. Helsinki: Helsingin yliopisto, bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta. 51 s. Saatavilla: <http://urn.fi/URN:ISBN:978-951-51-4563-5>.
- Vieler A, Wilhelm C, Goss R, Süß R, Schiller J. 2007. The lipid composition of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the diatom *Cyclotella meneghiniana* investigated by MALDI-TOF MS and TLC. Chemistry and Physics of Lipids 150:143–155.
- Wang G, Wang T. 2012. Characterization of Lipid Components in Two Microalgae for Biofuel Application. Journal of the American Oil Chemists' Society 89:135–143.
- Yao L, Gerde JA, Lee S-L, Wang T, Harrata KA. 2015. Microalgae Lipid Characterization. Journal of Agricultural and Food Chemistry 63:1773–1787.
- Yan J, Huang X, Ma S, Huang Z, Lü W. 2011. Culture conditions and cellular biochemical composition of two microalgae *Oocystis solitaria* and *Selenastrum* sp. Chinese Journal of Ecology 2011:12.
- Zeng M, Hao W, Zou Y, Shi M, Jiang Y, Xiao P, Lei A, Hu Z, Zhang W, Zhao L, Wang J. 2016. Fatty acid and metabolomics profiling approaches differentiate heterotrophic and mixotrophic culture conditions in a microalgal food supplement '*E.*'. BMC Biotechnology 16:49.

LIITTEET

Liite 1 *Selenastrum* sp. -mikrolevän rasvahappopitoisuudet

Taulukko 1. *Selenastrum* sp. -mikrolevän rasvahappopitoisuudet (mg/g) kokonaisuudessa (n=9) sekä fraktioissa 1–4 (n=4).

Rasvahappo	R1				R2				R3						
	Kokonais- uute	F1	F2	F3	F4	Kokonais- uute	F1	F2	F3	F4	Kokonais- uute	F1	F2	F3	F4
C14:0	1,49	0,05	0,27	1,09	0,53	1,40	0,11	0,56	0,47	0,48	1,42	0,03	0,57	0,50	0,46
C14:1	0,08					0,10					0,13				
C16:0	17,66	1,82	1,22	3,48	11,10	18,81	3,02	2,02	2,77	10,33	19,91	2,99	1,62	3,64	11,26
C16:1, n-7	0,69	0,23	0,62	0,72	0,29	0,51	0,22	0,48	0,16	0,33	0,33	0,22	0,88	0,96	0,15
C16:2, n-6				2,29	0,90		0,07	0,54	1,75	0,63		0,12	0,22	1,93	0,86
C16:3, n-3			0,12	0,27	0,17			0,12	0,39	0,13				0,32	0,17
C16:4, n-3				5,40	0,98		0,48	0,99	5,56	0,55		0,36	0,41	5,94	0,93
C18:0	1,11	0,46	0,33	0,66	0,38	0,93	0,55	0,36	0,30	3,16	1,06	0,58	0,33	0,49	0,34
C18:1, n-9	24,23	4,05	0,74	6,74	10,38	26,31	6,73	4,48	5,81	7,91	27,42	6,40	3,14	7,15	9,43
C18:1, n-7	0,42				0,07	0,45					0,31				
C18:2, n-6	19,57	0,32	0,04	10,05	6,74	15,38	1,02	3,61	6,02	3,56	17,91	0,99	2,11	8,42	5,22
C18:3, n-3	13,17	0,23		7,23	3,26	14,43	1,07	3,61	6,53	2,05	13,68	0,90	1,60	7,17	2,84
C18:4, n-3	6,62	0,34	0,27	1,23	2,73	6,90	1,12	2,30	2,08	0,83	6,81	0,90	1,05	1,97	1,98
C20:1, n-9	0,11	0,06				0,15	0,14				0,14				
C22:0	0,04					0,09					0,15				
C22:1, n-9	0,06					0,15					0,12				
C24:0	0,58					0,61					0,79			0,14	
C22:6, n-3	0,25					0,40				0,11	0,29			0,23	
Total	86,12	7,55	3,62	39,18	37,52	86,61	14,53	19,05	31,86	30,08	90,50	13,60	11,91	38,98	33,64

Liite 2 *E. gracilis* -mikrolevän rasvahappopitoisuudet

Taulukko 1. *E. gracilis* -mikrolevän rasvahappopitoisuudet (mg/g) kokonaisuuteissa (n=9) sekä fraktioissa 1–4 (n=6).

Rasvahappo	R1				R3					
	Kokonaisuute	F1	F2	F3	F4	Kokonaisuute	F1	F2	F3	F4
C12:0	0,72	0,29	0,25	0,10	0,08	0,72	0,40	0,20	0,12	
C14:0	6,95	3,62	1,53	0,48	1,33	7,57	4,38	1,71	0,65	0,83
C14:1	0,77	0,05	0,21		0,52	0,58		0,37	0,02	0,20
C15:0	1,27	0,62	0,26	0,04	0,35	3,16	1,37	0,47	0,23	1,09
C16:0	15,31	1,48	2,22	1,03	10,58	8,28	2,29	1,00	0,96	4,03
C16:1, n-7	5,04	0,36	0,34	0,17	4,17	2,60	0,53	0,32	0,70	1,04
C16:2, n-6	1,55	0,30	0,35	0,56	0,34	3,58	0,24	0,10	2,67	0,56
C16:3, n-3	5,79	0,42	0,60	0,71	4,05	5,08	0,43	0,20	3,63	0,82
C16:4, n-3	1,46	0,44	0,53	0,40	0,09	2,88	0,23		2,38	0,27
C18:0	1,87	0,39	0,61	0,32	0,55	1,57	0,49	0,44	0,31	0,33
C18:1, n-9	1,65	0,45	0,36	0,26	0,59	2,21	0,60	0,34	0,33	0,94
C18:1, n-7	4,98	0,11	0,42	0,14	4,31	1,82	0,39	0,20	0,26	0,98
C18:2, n-6	1,95	0,36	0,38	0,46	0,76	4,47	0,62	0,37	1,96	1,51
C18:3, n-3	4,53	0,68	0,90	1,04	1,90	8,96	0,92	0,88	5,44	1,72
C20:2, n-6	0,79	0,24	0,30		0,25	1,64	0,49	0,30	0,07	0,77
C20:4, n-6	0,90	0,22	0,28		0,40	2,65	0,61	0,43	0,40	1,21
C20:3, n-3	0,81	0,18	0,28		0,35	1,33	0,42	0,20		0,71
C20:4, n-3	0,16		0,05		0,11	0,91	0,19		0,26	0,46
C20:5, n-3	1,94	0,42	0,51	0,18	0,83	4,57	0,98	0,56	0,79	2,24
C22:6, n-3	1,11	0,21	0,31		0,59	2,75	0,61	0,05	0,38	1,72
Total	59,73	10,82	10,73	5,89	32,29	68,28	16,43	8,13	21,57	22,14